

Der Einfluss des Immunsystems auf den Organschaden in der schweren akuten Pankreatitis und die Rolle von Interleukin 33 im Mausmodell

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

Vorgelegt von

Anika Wilden

geb. 04.04.1993

in Aachen

Greifswald, den 27.11.2020

Dekan: Prof. Dr. Gerald Kerth

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Lalk
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus M Lerch
3. Gutachter: Prof. Dr. Robert Jaster

Tag der Promotion: 10.03.2021

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	V
II. Tabellenverzeichnis	VI
III. Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 akute und chronische Pankreatitis	1
1.2 Das Immunsystem	4
1.3 Angeborenes Immunsystem - Makrophagen.....	7
1.4 Adaptives Immunsystem – T-Zellen	9
1.5 Inflammation während der akuten Pankreatitis	11
1.6 Organversagen während der akuten Pankreatitis	13
1.7 Interleukin 33.....	15
1.7.1 Interleukin 33 in der akuten Pankreatitis	18
1.8 Therapie der akuten und chronischen Pankreatitis	19
2. Fragestellung	20
3. Methoden.....	21
3.1. <i>In vitro</i> Modelle.....	21
3.2. Makrophagen und Azinuszellen in Zellkultur	21
3.2.1 Makrophagenisolation	21
3.2.2 Azinuszellisolation	22
3.2.3 Co-Inkubation von Makrophagen und Azinuszellen oder LPS	22
3.2.4 Transkriptomanalysen von Makrophagen	23
3.2.5 Sandwich-ELISA für IL33 aus Überständen	23
3.3. β - Galactosidase-Detektion	24
3.4. <i>In vivo</i> – Pankreatitismodelle.....	25
3.4.1 Gangligatur – schwere akute Pankreatitis	25
3.5. Mausmodelle	26
3.5.1 sST2-Modell	26
3.5.2 IL33 knock-out Modell C57BL/6:IL-33–LacZ Gt mice (IL-33Gt)	26
3.5.3 Neutrophilen-Depletion in Wildtypmäusen	27
3.5.4 Monozyten-Depletion in Wildtypmäusen	28
3.6. Organentnahme	29
3.6.1 Blut.....	29
3.6.1.1 Amylase- und Lipase-Messung	29

3.6.1.2 Kreatinin-ELISA von Serumproben	30
3.6.2 Pankreas und Lunge	31
3.6.2.1 H&E-Färbung	31
3.6.2.2 Immunhistochemische Färbung (IHC)	32
3.6.2.3 MPO – Myeloperoxidase-Messung	33
3.6.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford	34
3.6.3 Monozytenisolation aus der Lunge für die Real-Time- Deformability-Cytometry (RT-DC)	35
3.6.3.1 Zellisolation aus der Lunge (Lung Dissociation Kit)	35
3.6.3.2 Monozytenisolation	35
3.6.3.3 Real-Time-Deformability-Cytometry (RT-DC)	36
3.6.4 Splenozytenisolation aus der Milz	36
3.6.4.1 Splenozytenfärbung für FACS-Analysen	37
3.6.4.2 Gating-Strategie der FACS-Analysen	39
3.7. Genanalysen von Organen	41
3.7.1 RNA-Isolation	41
3.7.2 Reverse-Transkriptase-Reaktion - cDNA	41
3.7.3 Quantitative RT-PCR	42
3.8 Statistische Analysen	42
4. Ergebnisse	43
4.1. Organschaden während der akuten Pankreatitis	43
4.1.1 Lungenschaden in der akuten Pankreatitis	43
4.1.2 Nierenschaden in der akuten Pankreatitis	44
4.2. Makrophagen während der akuten Pankreatitis in der Lunge	45
4.2.1 Real-Time-Deformability-Cytometry (RT-DC) von Monozyten	46
4.2.2 CD11b-Färbung als Nachweis für den Organschaden durch Monozyten	47
4.3. Neutrophilen- und Monozyten-Depletion in der akuten Pankreatitis	48
4.3.1 Überprüfung der Neutrophilen- und Monozyten-Depletion	48
4.3.2 Schweregradmarker der akuten Pankreatitis nach Neutrophilen- und Monozyten-Depletion	50
4.3.3 Lungenschaden und Funktion in der Neutrophilen- und Monozyten-Depletion	51
4.3.4 Nierenschaden in der Neutrophilen- und Monozyten-Depletion ..	52
4.4. Expression von IL33	53
4.4.1 Hochregulation von IL33 in Makrophagen	53

4.4.2 Transkriptomanalysen von Makrophagen	53
4.4.3 ELISA-Messung des Mediums der Makrophagen	55
4.4.4 X-Gal-Färbung zum Nachweis der IL33-Expression	56
4.4.4.1 X-Gal-Färbung von Makrophagen und Azinuszellen in Zellkultur	56
4.4.4.2 X-Gal-Färbung von Geweben	57
4.5. sST2-Modell – akute Pankreatitis mittels Gangligatur	58
4.5.1 Schweregrad der akuten Pankreatitis im sST2-Modell.....	59
4.5.2 Das Immunsystem in der akuten Pankreatitis	61
4.5.2.1 Angeborenes Immunsystem im sST2-Modell	61
4.5.2.2 Adaptives Immunsystem im sST2 Modell - T-Zell- Aktivierung während der akuten Pankreatitis.....	62
4.5.2.3 T-Zell-Differenzierung im sST2-Modell während der akuten Pankreatitis	63
4.6 IL33-/- Modell – akute Pankreatitis mittels Gangligatur	64
4.6.1 Schweregrad der akuten Pankreatitis im IL33-/- Modell.....	65
4.6.2 Angeborenes Immunsystem in der akuten Pankreatitis im IL33-/- Modell	67
4.7. Die Rolle von IL33 in der akuten Pankreatitis im Organschaden ..	68
4.7.1 Die Rolle von IL33 im Lungenschaden während der akuten Pankreatitis	68
4.7.2 Die Rolle von IL33 im Nierenschaden während der akuten Pankreatitis	70
5. Diskussion	71
5.1 Organschaden in der akuten Pankreatitis	71
5.2 Makrophagen in der akuten Pankreatitis	72
5.3 Neutrophilen- und Monozyten- Depletion in der akuten Pankreatitis	73
5.4 Monozyten in der akuten Pankreatitis	75
5.5 IL33-Expression in der akuten Pankreatitis	76
5.6 sST2-Modell in der akuten Pankreatitis.....	77
5.7 Akute Pankreatitis im IL33-/- Modell.....	79
5.8 Die Rolle von IL33 im Organschaden.....	80
6. Schlussfolgerung	82
7. Zusammenfassung	84
8. Material	86
8.1 Mausstämme / Zelllinien.....	86

I. Abbildungsverzeichnis

8.2 Verbrauchsmaterial	86
8.2.1 H&E-Färbung	87
8.3 Kits	87
8.4 Antikörper	88
8.5 Geräte	89
8.6 Chemikalien	89
8.7 Puffer/ Gele	90
8.8 Stimulation / Zytokine / Proteasen.....	90
8.9 Primer.....	90
8.10 Medium	90
8.11 Gegenstände.....	91
8.12 Software	91
9. Literaturverzeichnis.....	92
10. Eigenständigkeitserklärung.....	101
11. Danksagung.....	102

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Bezeichnung	Seite
1	Makrophagen-Differenzierung	8
2	T-Zell-Differenzierung	10
3	Interleukin 33 Ausschüttung & Einfluss	16
4	IL33-Spaltung	17
5	Gangligatur im Pankreas	25
6	Gating-Strategie T-Zellen	39
7	Gating-Strategie MDSC	40
8	Gating-Strategie ILCs	40
9	Lungenschaden in der akuten Pankreatitis	43
10	Nierenschaden in der akuten Pankreatitis	44
11	Makrophagen in der Lunge während der AP	45
12	RT-DC Messung Monozyten in der Lunge	46
13	CD11b-Färbung in Lunge und Niere	47
14	Überprüfung Neutrophilen-Depletion	48
15	Überprüfung Monozyten-Depletion	49
16	Schweremarker Amylase und Lipase nach Neutrophilen- und Monozyten-Depletion	50
17	H&E-Färbung Pankreas nach Neutrophilen- und Monozyten-Depletion	50
18	Lungenschaden und Funktion während der Neutrophilen- und Monozyten-Depletion	51
19	Nierenschaden während der Neutrophilen- und Monozyten-Depletion	52
20	Transkriptionsanalysen von Makrophagen in der AP	54
21	IL33 ELISA-Messung im Medium	55
22	X-Gal-Färbung Azinuszellen und Makrophagen	56
23	X-Gal-Färbung Pankreas 0d	57
24	X-Gal-Färbung Pankreas 3d	57
25	X-Gal-Färbung Pankreas 3d	57
26	X-Gal-Färbung Lymphknoten 0d	57

II. Tabellenverzeichnis

27	X-Gal-Färbung 0d Darm	57
28	X-Gal-Färbung 3d Darm	57
29	X-Gal-Färbung 0d Lunge	58
30	X-Gal-Färbung 3d Lunge	58
31	X-Gal-Färbung 3d Niere	58
32	Schweregradmarker Amylase und Lipase im sST2- Modell	59
33	H&E-Färbung Pankreas im sST2-Modell	60
34	Auswertung H&E-Färbung Pankreas im sST2- Modell	60
35	Angeborenes Immunsystem im sST2-Modell	61
36	Adaptives Immunsystem im sST2-Modell	62
37	T-Zell -Differenzierung im sST2-Modell	63
38	Schweregradmarker Amylase und Lipase im IL33-/- Modell	65
39	Schaden im Pankreas im IL33-/- Modell (H&E- Färbung)	66
40	Angeborenes Immunsystem im IL33-/- Modell	67
41	Lungenschaden im IL33-/- Modell	68
42	CD11b-Färbung in der Lunge im IL33-/- Modell	69
43	Nierenschaden im IL33-/- Modell	70

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung	Seite
1	T-Zell-Panel für FACS-Analysen – extrazelluläre Antikörper	38
2	T-Zell-Panel für FACS-Analysen –intrazelluläre Antikörper	38
3	MDSC-Panel für FACS-Analysen	38
4	ILC-Panel für FACS-Analysen – extrazelluläres Panel	38
5	ILC-Panel für FACS-Analysen – intrazelluläres Panel	38

III. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
0/3d	0/3 days - Tage
2 N H ₂ SO ₄	2 normale Schwefelsäure
Alexa	Alexa Fluor
APC	Allophycocyanin
ARDS	acute respiratory distress syndrome
Arg1	Arginase 1
BCR	B-Zell Rezeptor
BMDM	bone marrow derived macrophages
BSA	bovine serum albumin
BV	brilliant violett
Bzw	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CBA	Cytometric Bead Array
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G-250
CCK	Cholecystokinin
CD (80/86; 28...)	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CEL	carboxyl ester lipase
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Const.	constant
COX2	Cyclooxygenase-2
CPA1	Carboxypeptidase A1
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
C-Terminus	Carboxy Terminus

III. Abkürzungsverzeichnis

CVD	Cardiovascular disease
Cy	Cyanine
DAB	Diaminobenzidin
DAMPS	damage associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERCP	endoskopisch retrograde Cholangio- Pankreatikografie
EUS	endoskopische Ultraschalluntersuchung
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fc	fragment crystallisable
FCS	fetal calf serum
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC-A	Forward-Scatter- Area
Gata3	GATA Binding Protein 3
gMDSC	granulocytic-myeloid-derived suppressor cells
H&E	Hämatoxylin und Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HOCL	Hypochlorige Säure
HRP	Horseradish Peroxidase
i.p	intra peritoneal
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN γ	Interferon γ
IgE	Immunoglobulin E
ICH	Immunhistochemie
IL (10,13...)	Interleukin (10,13...)
IL33-/-	Interleukin 33 knock-out Maus
IL33Gt/+	Interleukin 33 heterozygote knock-out Maus

III. Abkürzungsverzeichnis

ILCs	innate lymphoid cells
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
M1/M2 Makrophagen	M1/M2 Typ Makrophage
MAP Kinase	mitogen-activated protein Kinase
Max	maximal
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MDSC	myeloid derived suppressor cells
mg	milligram
MHC	major histocompatibility complex
Min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	milliMolar
mMDSC	monocytic-myeloid derived suppressor cells
MPO	Myeloperoxidase
MRCP	Magnetresonanztomographie Cholangiopankreatikographie
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	multiple sclerose
mU	mili Units
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NET	neutrophil extracellular Traps
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGAL	neutrophilgelatinase-assoziierte Lipocalin
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure-Komplex
NK Zellen	natürliche Killerzellen

III. Abkürzungsverzeichnis

nm	nanometer
NO	Stickstoffmonozyt
N-Terminus	Amino Terminus
Oligo dT	Oligo Desoxythymidine
PAF	platelet activating factor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin Streptavidin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PG	Prostaglandine
PRSS1	Trypsin 1 Gen
QC	Quant Center
qrt-PCR	quantitative real time PCR
RA	rheumatoide arthritis
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonukleasen
Rory t	Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
Sec	second / Sekunde
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SPINK1	Serin-Protease-Inhibitor Kazal-Typ 1
SSC-A	Sidescatter-Area
sST2	soluble suppression of tumorigenicity 2 receptor
ST2	suppression of tumorigenicity 2 receptor
Tbet	T-Box-Transkriptionsfaktor
TCR	T-Zell Rezeptor
TGFβ	Transforming growth factor beta
Th1	T1-Helferzelle
Th17	T17-Helferzelle

III. Abkürzungsverzeichnis

Th2	T2-Helferzelle
Th9	T9-Helferzelle
TNF α	tumor necrosis factor alpha
TRAF	Tumor necrosis factor receptor (TNFR)- associated factors
Tregs	regulatorische T Zellen
WT	Wildtyp
Vs.	versus
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D- galactopyranosid
z.B	zum Beispiel

1. Einleitung

Während der akuten Pankreatitis kommt es in 20% der Fälle zu einem schweren Verlauf der Erkrankung, der mit Organversagen in der Lunge und den Nieren assoziiert ist (1). Es ist bekannt, dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt, bei der große Mengen an Zytokinen ausgeschüttet werden (2). Leukozyten infiltrieren das Pankreas und verstärken den Gewebeschaden. Es kommt zur Freisetzung von DAMPs, die das angeborene und adaptive Immunsystem aktivieren (3). Bislang ist nicht gut untersucht, wie das Immunsystem den schweren Verlauf der akuten Pankreatitis beeinflusst und es gibt wenig Theorien über den Organschaden in der Lunge und den Nieren.

In dieser Arbeit wurde das Immunsystem, im Speziellen Makrophagen und Monozyten, die zum angeborenen Immunsystem zählen, in Bezug auf den Organschaden in der Lunge und den Nieren untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss und die Manipulation des Interleukin 33 (IL33) auf diese Zellen und somit auf den Organschaden untersucht.

1.1 akute und chronische Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist eine der häufigsten nicht malignen gastrointestinalen Erkrankungen, die zu Krankenhausaufenthalten führt (4). Sie ist als Selbstverdau des Pankreas durch seine eigenen Proteasen wie z.B. Trypsin, Elastase und Chymotrypsin definiert. Als Ursprung der Erkrankung wird die frühzeitige intrazelluläre Aktivierung dieser Verdauungsenzyme angesehen. Dies führt zum Zelltod der Azinuszellen und zur Schädigung des Gewebes. Unter physiologischen Bedingungen werden die meisten Proteasen als inaktive Vorstufen synthetisiert und auch sezerniert. So wird Trypsinogen erst im Dünndarm durch das Bürstensaumenzym Enterokinase zu Trypsin aktiviert. Daneben gibt es noch weitere protektive Mechanismen, welche eine verfrühte Proteaseaktivierung verhindern sollen, dazu gehören z.B. die Autolyse von aktivem Trypsin, Enzymkompartimentierung, die Synthese des

1. Einleitung

Trypsininhibitors SPINK-1 sowie ein geringes Level an Ca^{2+} (5). Die Ursache für die akute Pankreatitis sind zu 38% ein biliärer Aufstau, verursacht durch Gallenwegserkrankungen, zu ca. 36% Alkoholmissbrauch, und in wenigen Prozenten Medikamentenverursacht oder durch eine Stoffwechselerkrankungen bedingt (3). Durch einen Gallenstein kann die Pankreatitis ausgelöst werden, wenn der intraductale Druck ansteigt und über druckempfindliche Ca^{2+} Kanäle ein pathophysiologisches Ca^{2+} Signal in den Azinuszellen entsteht, woraus eine verfrühte Proteaseaktivierung resultiert. Der Mechanismus, der hinter der durch Alkohol ausgelösten Pankreatitis steht, ist noch weitestgehend unbekannt. Die Gruppe von Gorelick et al. (2003) konnte zeigen, dass Ethanol Azinuszellen für die CCK Stimulation sensibilisiert, was zur Zymogenaktivierung führt und somit zur intrazellulären Aktivierung von Trypsinogen (6).

Im Duodenum wird Trypsinogen durch die Enterokinase aktiviert. Diese wird in Azinuszellen nicht exprimiert, hier übernimmt die lysosomale Hydrolase Cathepsin B die Aufgabe und ist in der Lage Trypsinogen zu Trypsin zu aktivieren. Damit es zu einer Cathepsin B vermittelten Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin kommt müssen beide Enzyme im gleichen subzellulären Kompartiment lokalisiert sein. Die sogenannte Co-Lokalisations-Hypothese, geht davon aus, dass die Vorstufen der Verdauungsenzyme, welche in Zymogengranula lokalisiert sind, und lysosomale Enzyme (z.B. Cathepsin B und Cathepsin L), die in Lysosomen sortiert werden, gemeinsam in einem Kompartiment vorliegen (3). So kann Trypsinogen von Cathepsin B zu Trypsin aktiviert werden (7), was zu einer Kaskade von weiterer Aktivierung von Verdauungsenzymen führt. Es ist bekannt, dass Trypsin in der Lage ist, weitere Verdauungsenzyme zu aktivieren. Wie es zu einer Co-Lokalisation der Zymogene und lysosomalen Hydrolasen kommt, ist wiederum nicht genau bekannt. Es gibt zum einen den Ansatz, dass es im Zuge der Sekretionsblockade in den Azinuszellen zu einem Misssorting im endoplasmatischen Retikulum (ER) kommt, wodurch Cathepsin B fälschlicher Weise in die Zymogengranula verpackt wird. Zum anderen gibt es den Ansatz, dass es zu einer Fusion beider Kompartimente kommt und somit zum Kontakt und zur Aktivierung (8).

1. Einleitung

Als Symptome der Pankreatitis werden plötzlich eintretende Oberbauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen beschrieben. Die Schmerzen strahlen in 90% der Fälle gürtelförmig in den Rücken aus. Als Laborparameter werden Amylase, Lipase, C-reaktives Protein (CRP) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) gemessen. Wenn Amylase und Lipase um mindestens das Dreifache erhöht sind, kann der Verdacht einer akuten Pankreatitis bestätigt werden (5).

80% der akuten Pankreatitiden verläuft mild (5). Dieser Verlauf ist selbstlimitierend und führt nicht zu Einschränkung von Funktion oder Struktur des Pankreas. In 20% der Fälle nimmt die Erkrankung einen schweren Verlauf (5). Dieser Verlauf ist mit schweren systemischen Komplikationen, wie z.B. Organversagen oder einer Infektion der Pankreasnekrose assoziiert und resultiert in einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität. Ursächlich dafür ist die schwere Entzündungsreaktion, welche sich im Zuge der Pankreatitis ausbildet. Die schwere akute Pankreatitis ist oft verbunden mit Multiorganversagen, dabei korreliert die Prognose der akuten Pankreatitis mit der Schwere der Organversagen und mit infizierten pankreatischen Nekrosen (9). Für die akute Pankreatitis gibt es keine direkte Therapiemöglichkeit. Patienten werden eng überwacht und erhalten eine Flüssigkeitssubstitution sowie eine Schmerzmedikation.

Kommt es zu wiederkehrenden akuten Schüben von Pankreatitiden so spricht man von einer chronischen Pankreatitis. Häufig ist diese durch Alkohol oder Rauchen induziert (10) (11). Im Verlauf der chronischen Pankreatitis kommt es zu einem schleichenden Verlust des exokrinen und endokrinen Gewebes, welcher mit chronischem abdominalem Schmerz sowie exokriner und endokriner Insuffizienz assoziiert ist (12) (13). Der Verlust des exokrinen und endokrinen Gewebes wird durch fibrotisches Narbengewebe ersetzt (14), wodurch es zu einem Verlust der Pankreasfunktion kommt. 20% der chronischen Pankreatitiden sind verursacht durch genetische oder idiopathische Komponenten (15). Alkohol und Rauchen (16) sind die Risikofaktoren in der adulten chronischen Pankreatitis, während genetische Varianten eher in der pädiatrischen

1. Einleitung

chronischen Pankreatitis eine Rolle spielen (15). Im Laufe der letzten Jahre wurden verschiedene genetische Risikofaktoren identifiziert. Bekannt sind zum Beispiel Varianten wie im kationischen Trypsinogen (PRSS1), im *Serine Protease inhibitor Kazal Type 1* (SPINK1), im *cystic fibrosis trans membrane conductance regulator* (CFTR), im *Carboxypeptidase A1* Gen (CPA1) und im *carboxyl ester lipase gene* (CEL) (17).

Um eine Diagnose der chronischen Pankreatitis zu stellen, ist neben der Beobachtung der Symptome eine Biopsie unerlässlich. Ebenso ist die Bildgebung in Form einer Sonografie, MRCP, endoskopisch mittels ERCP, endoskopisch mittel EUS, oder über ein CT notwendig (15). Patienten mit chronischer Pankreatitis haben ein erhöhtes Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (18).

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem wird in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt. Dabei gehören zum angeboren Immunsystem z.B. die Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen, Mastzellen sowie Killerzellen und ILCs. Das angeborene Immunsystem ist die erste Antwort auf eine Infektion und reagiert schnell und unspezifisch. Das adaptive Immunsystem wird aktiviert, wenn das angeborene Immunsystem es nicht schafft, die Infektion zu beheben. Das adaptive Immunsystem reagiert dadurch erst später, aber dafür sehr spezifisch (19).

Makrophagen sind mit einer Größe von 25-50 µm, Zellen des angeborenen Immunsystems, die zu den Leukozyten gehören und sogenannte Fresszellen sind (20). Im Knochenmark entstehen aus Stammzellen die Monozyten, die im Blutkreislauf durch Kontakt mit Zytokinen zu Makrophagen differenzieren (21). Makrophagen phagozytieren Krankheitserreger, Fremdstoffe oder geschädigtes Gewebe und eliminieren diese mit Hilfe von Verdauungsenzymen aus, durch die Phagozytose verschmolzene, Lysosomen. Je nach Zytokinmilieu differenzieren sie zu M1- oder M2-Makrophagen (21).

1. Einleitung

Neutrophile gehören ebenfalls zu den Leukozyten und machen einen Anteil von 50-65% aus. Sie dienen der Abwehr von Pathogenen und sind ebenfalls in der Lage Pathogene zu phagozytieren. Zusätzlich besitzen sie Granula-Vesikel, gefüllt mit bakteriziden Substanzen, die durch Freisetzung zum Abtöten von Mikroorganismen führen. Als dritter Mechanismus der Neutrophilen ist die NETose bekannt (22). NETs sind „Neutrophile Extracellular Traps“, die durch Pilze, Bakterien, Viren, Protozoen und weiteren Faktoren ausgelöst werden. Der Vorgang der NETs ist beschrieben als Zelltod, durch Translokation von Elastasen aus primären Granula in den Kern, wo Histone gespalten werden und es zur Chromatin-Dekompensation kommt (23). Es entstehen Strukturen aus Chromatin, die antimikrobielle Proteine enthalten. Trifft ein Neutrophil auf Pathogene, schleudert dieser seine DNA in Form von NETs aus und kann somit das Pathogen einfangen und abtöten. Neutrophile schaffen somit eine sehr hohe, lokale Konzentration von antimikrobiellen Substanzen, ohne dabei eigene Zellen zu schädigen.

ILCs sind *innate lymphoid cells*. Sie gehören zu den lymphoiden Zelllinien, ähneln T- und B-Zellen und besitzen jedoch keinen Rezeptor (24). Während der Inflammation spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Homöostase und Inflammation. Bei einer Dysregulation der ILCs kommt es zu Erkrankungen, wie Allergie, Asthma oder autoimmunen Erkrankungen (25).

Dendritische Zellen gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) (26). Sie erkennen ein Antigen, nehmen dieses auf und präsentieren dieses den naiven T-Zellen, die dadurch aktiviert werden und proliferieren (27). Mastzellen spielen eine wichtige Rolle bei IgE vermittelten Allergien vom Typ1. Sie induzieren eine massenhafte Produktion von IgE durch Plasmazellen. Die IgE haften mit ihrem Fc Teil an die Mastzellen, welche bei einem Zweitkontakt zum gleichen Antigen reagieren, wodurch es zur allergischen Reaktion kommt. Durch die IgE behafteten Mastzellen, kommt es innerhalb von Sekunden bis Minuten zur Reaktion (28).

Neben den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gibt es zusätzlich die humorale Komponente in Form des Komplementsystems.

1. Einleitung

Das Komplementsystem ist einer der ersten Mechanismen, um gegen Pathogene vorzugehen. Es kann Antikörper steuern, die Pathogene eliminieren. Zum Komplementsystem gehören mehr als 60 Plasma- und Oberflächenproteine, unter denen es neun zentrale essentielle Proteine C1-C9 gibt (29), um eine Aktivierungskaskade der Proteine auszulösen.

Das angeborene Immunsystem ist keine spezifische Immunantwort, sondern reagiert schnell (in Minuten bis Stunden) und nutzt bereits vorhandene Mechanismen, zu denen neben der humoralen und Zellantwort auch die natürlichen Barrieren, wie z.B. die Haut und Mukosa und Zellrezeptoren oder Zytokine gehören. Dieses System ist die erste Antwort auf die Invasion von Pathogenen und anderen Antigenen. Es ist da, um Pathogene zu eliminieren und eine Inflammation vorzubeugen. Schafft es dieses nicht, aktiviert es das adaptive Immunsystem (29).

Zum adaptiven Immunsystem gehören die B-Zellen und T-Zellen. Die adaptive Immunantwort ist die spezifische Immunantwort, die spezifisch auf pathogene Antigene reagiert (30). Dieses wird durch das zuvor aktivierte angeborene Immunsystem aktiviert (19). Das adaptive Immunsystem benötigt deutlich mehr Zeit als das angeborene und wird erst innerhalb von Tagen bis Wochen aktiviert (29). B- und T-Zellen sind die einzigen Zellen des Immunsystems, die mit ihren Rezeptoren (BCR und TCR) spezifisch Antigene erkennen und darauf reagieren können (29). B-Zellen können sich in Plasmazellen differenzieren und produzieren spezifische Antikörper. Diese bilden die humorale Immunantwort des adaptiven Immunsystems, während die T-Zellen die zelluläre Immunantwort bilden. Durch die hohe Variabilität der Rezeptoren ist es dem adaptiven Immunsystem möglich, variable Antigene zu erkennen und darauf zu reagieren (31). Für die T-Zellaktivierung ist eine Antigenpräsentation wichtig. Antigenpräsentierende Zellen nehmen das Antigen auf, prozessieren dieses und präsentieren dieses auf MHC-Molekülen in lymphatischen Organen auf ihrer Oberfläche. T-Zellen binden zunächst unspezifisch an Antigen-präsentierende Zellen (APC) und nähern sich ihnen so an. Sie tasten das Antigen und die Oberflächenmoleküle mit ihrem Rezeptor nach spezifischen Peptiden ab. Hat eine T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkannt, bekommt sie das Signal

1. Einleitung

1 durch die Bindung des T-Zellrezeptors an den MHC-Komplex (32) und die Bildung einer immunologischen Synapse (33). Die T-Zelle und die Antigen-präsentierende Zelle binden aneinander und können somit über Zytokine und die immunologische Synapse wechselwirken und kommunizieren (33). Die T-Zelle erhält weitere Signale, Signal 2 und 3, um sich zu einer T-Effektorzelle zu entwickeln und zu proliferieren (32). Für Signal 2 sind co-stimulierende Moleküle verantwortlich, wie CD80/86 auf der APC und CD28 auf der T-Zelle. Diese Co-stimulation führt zur Ausschüttung von IL2 und der Synthese von CD25. Signal 3 erhält die Zelle durch die Ausschüttung spezifischer Zytokine, die bestimmen, in welche T-Effektorzelle die naive T-Zelle differenziert. Erhält eine T-Zelle alle drei Signale, kommt es zur Proliferation der Zelle, was bedeutet, dass die Zelle in wenigen Tagen zahlreiche Zellteilungen durchläuft und es somit zu einer hohen Anzahl an spezifischen T-Zellen kommt (34), die sich spezifisch gegen das Antigen richten.

1.3 Angeborenes Immunsystem - Makrophagen

Makrophagen, die durch freigesetzte Mediatoren aus dem geschädigten Pankreasgewebe aktiviert werden, wandern in das Pankreas ein (3). Eingewanderte Makrophagen können sich, abhängig von ihrer Umgebung zu M1- oder M2-Makrophagen entwickeln und haben multiple Funktionen. Pro-inflammatorische Stimuli wie IL6, TNF α oder LPS differenzieren eingewanderte Makrophagen zu pro-inflammatorischen Makrophagen (M1-Typ). Pro-inflammatorische Makrophagen phagozytieren das nekrotische Gewebe und können durch Zytokinausschüttung zur pro- Inflammation und zu weiterem Schaden beitragen (35) (36). Als pro-inflammatorische Zytokine schütten sie TNF α (*Tumor necrosis factor*), IL1 β und IL6 aus. Zusätzlich exprimieren sie iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) und COX2 (*Cyclooxygenase 2*), die ebenfalls eine pro-inflammatorische Funktion haben (37). Unter den Th2-Zell-Zytokinen IL4 und IL13 differenzieren Makrophagen zu anti-inflammatorischen M2a-Makrophagen. Diese Makrophagen werden alternative oder wundheilende Makrophagen genannt. Diese können kein NO (Stickstoffmonoxid) produzieren,

1. Einleitung

exprimieren jedoch Arginase 2 (38). M2a-Makrophagen haben einen großen Beitrag an der Gewebereparatur und Regeneration (39). Neben den M2a-Makrophagen gibt es die M2b-Makrophagen, die als regulatorische Makrophagen bezeichnet werden. Naive Makrophagen differenzieren unter IL10 Einfluss zu M2b-Makrophagen. Sie exprimieren TGF β (*Transforming growth factor*) und IL10 und können somit pro-inflammatorische Zellen hemmen (40). Als Oberflächenmarker exprimieren sie hohe Level an CD80 und CD86, mit denen sie T-Zellen während der Antigenpräsentation co-stimulieren können (37).

In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass pankreatische Enzyme, wie z.B. Trypsin, Elastase, Carboxypeptidase A oder Lipase dazu führen, dass Makrophagen TNF α ausschütten (41). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Makrophagen während der akuten Pankreatitis aktiviert werden und eine Rolle in der Immunantwort spielen. Durch die Freisetzung von Zytokinen und Enzymen beeinflussen Makrophagen, getriggert durch den Gewebeschaden, die Immunantwort und haben einen großen Einfluss auf diese (42). Es ist bekannt, dass die Menge von Zytokinen wie TNF α , IL6, IL10 und MCP-1 in der akuten Pankreatitis ansteigen und somit die Immunantwort beeinflussen (43).

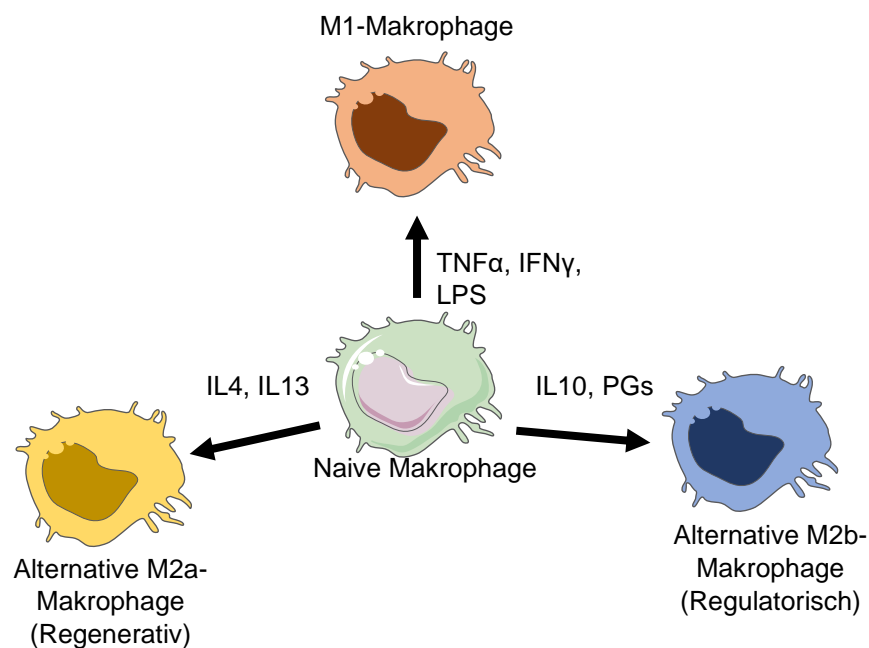


Abb.1: Naive Makrophagen (grün) differenzieren sich nach Aktivierung je nach Zytokinmilieu in unterschiedliche Subtypen. Liegen die Zytokine TNF α , IFN γ oder LPS vor, differenzieren sie in pro-inflammatorische M1-Makrophagen (orange). Liegen während der Aktivierung IL4 und IL13 vor, differenzieren sie in Alternative M2a-Makrophagen (gelb), die regenerative Wirkung haben. Durch die Zytokine IL10 und PGs differenzieren naive Makrophagen in Alternative M2b-Makrophagen, die regulatorische Funktionen übernehmen (blau).

1.4 Adaptives Immunsystem – T-Zellen

Bei den T-Zellen gibt es verschiedene Subpopulationen. Je nach Aktivierung und Zytokinmilieu entwickeln sie sich zu unterschiedlichen Subtypen. Robert Coffman und Tim Mossman konnten 1987 zeigen, dass nicht jede T-Zelle die gleichen Zytokine ausschüttet, sondern, dass es unterschiedliche Typen von T-Zellen gibt (44). Es gibt Th1-Zellen, die charakterisiert sind durch die Ausschüttung von IFN γ (Interferon γ) und IL2, die sich durch den Einfluss von IL12 und IFN γ entwickeln und als pro-inflammatorisch gelten. Th2-Zellen hingegen sind charakterisiert durch die Ausschüttung von IL4, IL5, IL10 und IL13 und wirken anti-inflammatorisch bzw. immunregulierend. Sie entwickeln sich unter dem Einfluss von IL4. Th1-Zellen tragen als Transkriptionsfaktor *tbet* und Th2-Zellen tragen GATA3. Ein weiterer Subtyp sind Th17-Zellen, die eine Population mit pro-inflammatorischer Wirkung darstellen. Diese entwickeln sich durch den Einfluss von IL6 und TGF- β (45) und exprimieren IL17, IL21, TNF α und IL22 (45). Sie sind zusätzlich charakterisiert durch den Transkriptionsfaktor *Roryt*. Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel bei Multipler Sklerose (MS) oder rheumatoider Arthritis (RA) (45). Zusätzlich konnten Th9-Zellen identifiziert werden. Die Entwicklung dieser Zellen konnte aus Th2-Zellen unter dem Einfluss von IL4 und TGF- β gezeigt werden. Diese Zellen exprimieren IL9, welches ein potenter Wachstumsfaktor für Mastzellen ist (46).

Eine weitere Subpopulation sind regulatorische T-Zellen (Tregs). Diese Zellen, die ein anti-inflammatorisches Milieu schaffen, schütten Zytokine, wie IL10 und TGF β aus und sind charakterisiert als CD4⁺CD25⁺ Zellen, die als Transkriptionsfaktor FoxP3 tragen. IL10 ist ein regulatorisches Zytokin und spielt eine wichtige Rolle bei der Einstellung eines anti-inflammatorischen Milieus (47). Die Immunantwort beinhaltet also Gewebezerstörung und Reparaturmechanismen (48). Die Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine führt zur Suppression des Immunprozesses, durch Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen und der Reduktion der Produktion von pro-

1. Einleitung

inflammatorischen Zytokinen. Zudem inhibiert IL10 IL1 und TNF α und reguliert die Zytokinrezeptorexpression und Zellaktivierung herunter.

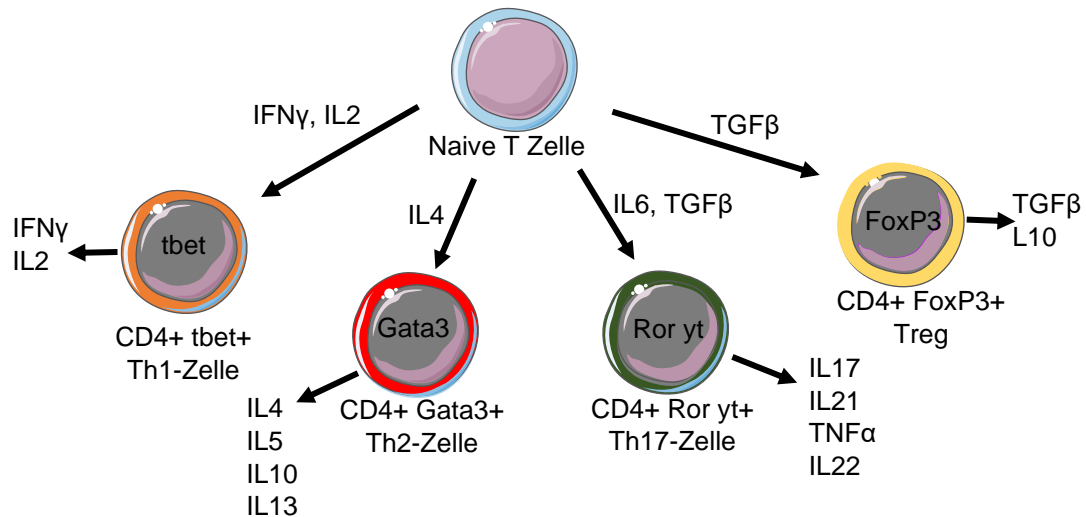


Abb.2: Es gibt verschiedene T-Zellpopulationen, die aus naiven T-Zellen entstehen. Bei der Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen spielt das Zytokinmilieu, das die Zellen umgibt eine wichtige Rolle. Naive T-Zellen differenzieren in Th1-Zellen, wenn IFN γ und IL2 vorhanden ist, in Th2-Zellen, wenn IL4 vorhanden ist und in Th17-Zellen wenn IL6 und TGF β vorliegen. T-Helferzellen sind CD4+ und unterscheiden sich in den Subpopulationen in den Transkriptionsfaktoren. Th1-Zellen tragen tbet, Th2-Zellen Gata3 und Th17-Zellen Ror γ t. Jeder Zelltyp schüttet sein eigenes Zytokinmuster aus. Regulatorische T-Zellen werden unter TGF β induziert und tragen den Transkriptionsfaktor FoxP3.

1.5 Inflammation während der akuten Pankreatitis

Während der Entzündungsreaktion in der akuten Pankreatitis wird eine große Menge an inflammatorischen Zytokinen ausgeschüttet. Dabei können Zytokine, wie IL6, IL8 und IL10 in Patienten nachgewiesen werden (2). Durch die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen kommt es zum *systemischen inflammatorischen response syndrom* (SIRS) (49), das zu Multiorganversagen führen kann. Nach dieser Hyperinflammation kommt es zu einem *kompensatorischen anti-inflammatorischen response syndrom* (CARS), das mit Immunsuppression einhergeht und somit zu sekundären Infektionen des Patienten führen kann. Ebenso kommt es durch das CARS zur bakteriellen Translokation in das Pankreas (50).

Es konnte gezeigt werden, dass SIRS und CARS nicht zwangsläufig nacheinander auftreten, sondern auch parallel ablaufen (51). Somit haben infiltrierte M1-Makrophagen teil am SIRS und periphere T-Zellen teil am CARS. Dabei werden die T-Zellen in lymphatischen Organen aktiviert und differenzieren Richtung Th2-Zellen, die anti-inflammatorische Eigenschaften haben (51). Ebenso steigt die Anzahl der regulatorischen T-Zellen signifikant an. Im geschädigten Pankreasgewebe konnte gezeigt werden, dass die infiltrierten Makrophagen mit IL1b, IL6, TNFa, and IL18 ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil aufweisen (52). Während das adaptive Immunsystem peripher zum CARS führt, leitet das angeborene Immunsystem das SIRS im geschädigten Pankreasgewebe (51).

Während der Pankreatitis kommt es zur Nekrose, die eine pro-inflammatorische Form des Zelltodes darstellt. Durch die Zerstörung des Gewebes kommt es zur Freisetzung von DAMPS (*damage-associated molecular patterns*), was zu einer Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems führt.

Makrophagen und Neutrophile wandern durch eine erhöhte Ausschüttung des Adhäsionsmoleküls ICAM1 in das verletzte Gewebe ein, entlassen Zytokine und steuern somit die Immunantwort (53) (35). Neutrophile und Makrophagen scheinen eine wichtige Rolle in der ersten Phase der akuten Pankreatitis zu spielen. Sie scheinen mit die erste Reaktion auf den

1. Einleitung

Schaden im Gewebe zu sein und sind an der Aktivierung von Trypsinogen beteiligt und somit verursachend für weiteren Schaden (54) (55). Makrophagen, die in das Pankreas infiltrieren entlassen Zytokine, wie TNFa, IL6, IL1b, MCP1 und PAF (56). In Studien konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Makrophagen durch die Injektion von Clodronat-Liposomen protektiv auf die Caerulein vermittelte Pankreatitis wirkt. Das lässt vermuten, dass Makrophagen eine wichtige Rolle in der Pankreatitis spielen (57).

Es ist bekannt, dass die T-Zellen während der Pankreatitis eine Rolle spielen. In T-Zell defizienten Mäusen (Balb/c nude mice) wurde eine akute Pankreatitis induziert und es konnte gezeigt werden, dass diese Tiere geringe Serum Amylase und Lipase hatten und in der histologischen Auswertung weniger Schaden zu sehen war (58). Um diese Ergebnisse weiter zu untersuchen, wurden T-Zellen von Balb/c Kontrollmäusen in die Balb/c nude Mäuse (Mäuse ohne T- und B-Zellen) transferiert. Dabei beobachteten Demols, A. et al. im Jahr 2000, dass der Schaden der Pankreatitis erhöht war (58). Auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Reduktion von T-Zellen vorteilhaft ist (59). Die gesamte Depletion der CD4⁺ T-Zellen mittels anti-CD4-Antikörper führte zu einem verminderten Schaden im Pankreas und zu verminderter Granulozyteninfiltration (60).

1.6 Organversagen während der akuten Pankreatitis

Während der akuten Pankreatitis kommt es in bis zu 20% der Fälle zu einem schweren Verlauf, welcher mit schweren Komplikationen wie z.B. Organversagen assoziiert ist. Das Organversagen kann sich in der frühen, sterilen Phase der akuten Pankreatitis entwickeln oder im späteren, septischen Verlauf, verursacht durch infizierte Nekrosen (1). Patienten, die ein SIRS entwickeln, entwickeln häufig Organversagen (61). Dabei sind das respiratorische, das renale und das kardiovaskuläre System am häufigsten betroffen (62). Die Schwere der Organ-Dysfunktion wird über den Marshall-Score bewertet, der aus dem SOFA-Score für die Sepsis Bewertung entwickelt wurde. Dabei gilt eine Dysfunktion, die einen Score ≥ 2 aufweist und über 48 Stunden anhält als persistente Dysfunktion und definiert eine schwere akute Pankreatitis (SAP) (1). Es gibt verschiedene Risikofaktoren für die Entwicklung eines Organversagens, wie z.B. das Alter, multimorbide Bedingungen, Übergewicht, genetische Prädispositionen oder die Ätiologie (63). Dabei spielt der Grad und die Anzahl der Organversagen eine wichtige Rolle für das Outcome der Patienten während der akuten Pankreatitis (64). Respiratorisches und renales Versagen haben ein ähnliches Outcome, während kardiovaskuläres Versagen das schlechteste Outcome für den Patienten bedeuten (65).

Während der schweren akuten Pankreatitis kommt es in 15-55% der Fälle zu pulmonalen Komplikationen (2). Es konnte gezeigt werden, dass Neutrophile nicht nur in das Pankreas einwandern sondern ebenso in die Lunge und auch dort eine pathologische Rolle spielen (53). Die Schwere der Komplikationen reicht dabei von milden Komplikationen bis hin zum *akuten respiratorischem distress Syndrom* (66). Das *akute respiratorische distress Syndrom* ist (ARDS) ist ein akutes Lungenversagen, bei dem es zu einem Lungenschaden kommt, sich Wasser in der Lunge ansammelt, es zur Abnahme der Sauerstoffsättigung im Blut kommt und Neutrophile einwandern (67). Es geht einher mit Kurzatmigkeit, rascher, flache Atmung, Zyanose (Blaufärbung der Haut), und Fehlfunktionen anderer Organe, wie Herz und Gehirn (68). Zur Behandlung wird Sauerstoff verabreicht und im

1. Einleitung

schlimmsten Fall müssen die Patienten auf der Intensivstation beatmet werden.

Neben akutem Lungenversagen, kommt es bei einigen Patienten zum akuten Nierenversagen (AKI – *acute kidney injury*), das von Dysfunktionen bis akutem Versagen und septischen Komplikationen reicht (18). Die AKI tritt bei bis zu 70% der Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis auf und erhöht das Mortalitätsrisiko signifikant (69). Diagnostiziert wird eine Schädigung der Nieren über erhöhte Kreatininwerte in Serum und Urin (69). Ebenso kann eine akute Nierenschädigung über die Messung von NGAL (*Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin*) im Urin oder Serum bestimmt werden (70). Als Symptome des akuten Nierenversagens sind eine inadäquate Eliminierung von Stickstoffabbauprodukten, sowie Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen und Appetitsverlust bekannt (71). Bei einem akuten Nierenversagen kommt es innerhalb von 48 Stunden zu einer Einschränkung der renalen Funktion und Struktur was zu einem Verlust der Exkretionsfunktion der Niere führt (72). Die AKI während der akuten Pankreatitis ist jedoch nicht ausreichend untersucht (72).

1.7 Interleukin 33

In diesem Projekt lag der Fokus auf dem Zytokin Interleukin 33 (IL33). IL33 ist ein Zytokin der Interleukin-1-Familie und wurde 1999 das erste Mal beschrieben (73). 2003 wurde es charakterisiert und Schmitz et al. (74) und Dinarello (75) beschrieben es 2005 als Zytokin der IL1-Superfamilie. IL33 ist reguliert über den Inflammasom-Caspase-Complex 1 (76). Es ist exprimiert in Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten ähnlichen Zellen (77). Ist IL33 im Kern lokalisiert agiert es als Transkriptionsregulator (78). Durch Verletzung und geschädigtes Gewebe wird dieses Zytokin als Alarmin freigesetzt und hat Einfluss auf Zellen, die den ST2- (*suppression of tumorigenicity 2 receptor*) Rezeptor (IL-1RL1) exprimieren (76). IL33 hat Einfluss auf verschiedene Zellen des Immunsystems, wie z.B. Th2-Zellen, ILCs, Tregs, NK Zellen, B-Zellen, Neutrophile, Makrophagen oder CD8+ T-Zellen (79). Bindet IL33 an diesen Rezeptor, kommt es zur Dimerisierung mit dem membranständigen akzessorischen Protein (IL1-RacP) und zur Aktivierung von IL1-assoziierten Kinasen und weiterer Kaskaden, die über die Rekrutierung von MyD88, NF- κ B und MAP-Kinasen vermittelt werden. Diese Kaskade führt zu inflammatorischen Effekten (74). Es ist bekannt, dass der IL33/ST2-Pathway eine Rolle in der Immun- und Zell-Homöostase spielt und die Wundheilung und Gewebereparatur unterstützt (80). IL33 spielt eine wichtige Rolle in der Th2-Zell beeinflussten Immunantwort. Es führt zur Ausschüttung von Zytokinen der Th2-Zellen, wie IL5 und IL13 (79). ILC2-Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Basophilen und Tregs schütten ebenfalls Zytokine aus (81). Der IL33/ST2-Pathway hat somit hauptsächlich anti-inflammatorische Effekte (80). Neben dem membran-gebundenen Rezeptor ST2 gibt es eine lösliche Form dieses Rezeptors, sST2, der ebenfalls IL33 binden kann. Dieser Rezeptor agiert als Fangrezeptor und kann IL33 binden und somit den Einfluss auf Immunzellen beeinflussen. sST2 wird von Epithelzellen und Immunzellen ausgeschüttet und reguliert die Wirkung von IL33 (78).

Wird IL33 als Alarmin aus geschädigtem Gewebe oder aktivierten Makrophagen freigesetzt, liegt es als pro-IL33 vor, welches eine Größe von ca. 30 kDa hat und bereits aktiv ist. Beim Menschen besteht das Zytokin

1. Einleitung

aus 270 und bei der Maus aus 266 Aminosäuren. Am N-Terminus gibt es das Kernlokalisationssignal, welches verantwortlich für die Lokalisation im Kern ist und am C-Terminus ist die IL1-ähnliche Domäne, die für die Rezeptorbindung verantwortlich ist. Das pro-IL33 bindet im Kern und ist für die Genregulation verantwortlich (82).

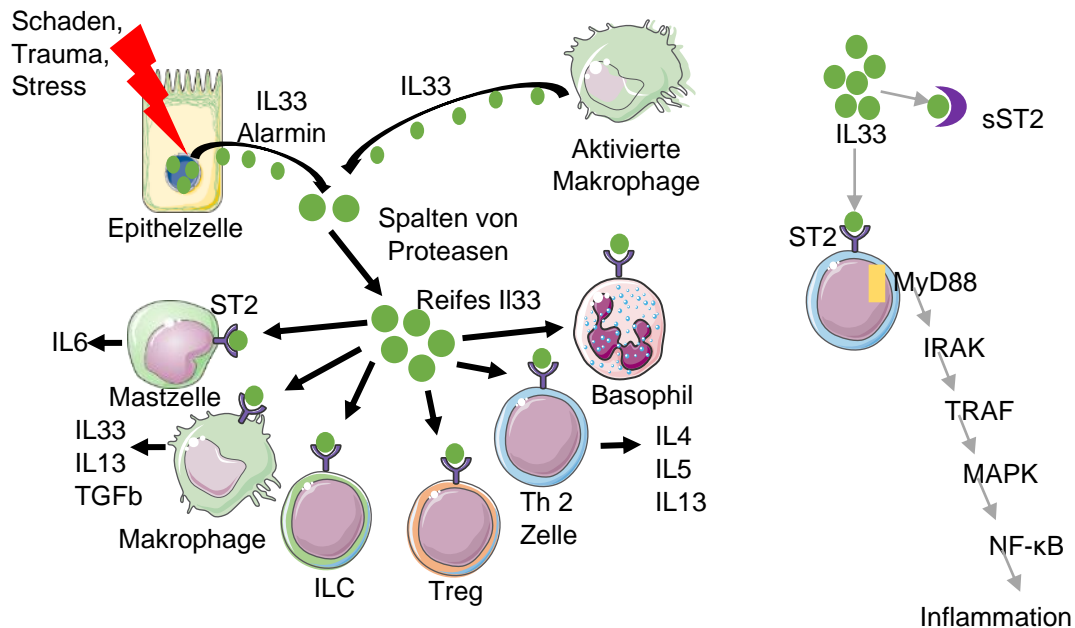


Abb.3: IL33 wird von geschädigten Epithelzellen oder aktivierten Makrophagen als Alarmin ausgeschüttet. Es kann durch inflammatorische Proteasen in ein höher aktives IL33 gespalten werden und bindet an den ST2-Rezeptor. Dieser liegt auf einer Vielzahl der Immunzellen vor. Bindet IL33 über ST2 an Immunzellen, kommt es zu einer Signalkaskade über MyD88, IRAKs, TRAFs, MAPK und NFκB und es werden inflammatorische Effekte ausgelöst. Immunzellen schütten inflammatorische Zytokine aus, die die weitere Immunantwort beeinflussen.

Zwischen der Kerndomäne und der IL1-like Domäne gibt es eine Aktivierungsdomäne, die Spaltstellen für Proteasen aufweist. Kommt es zu einer Spaltung des pro-IL33 in kleine Formen, die ca. 18-20 kDa groß sind, konnte bereits gezeigt werden, dass dieses bis zu 30-fach reaktiver ist (83). Gespalten wird das IL33 durch angelockte Mastzellen (83) oder Neutrophile (81). Mastzellen spalten das IL33 mit Chymasen und Tryptase (83) und Neutrophile können pro-IL33 durch die neutrophilen Elastase oder Cathepsin G spalten (81).

1. Einleitung

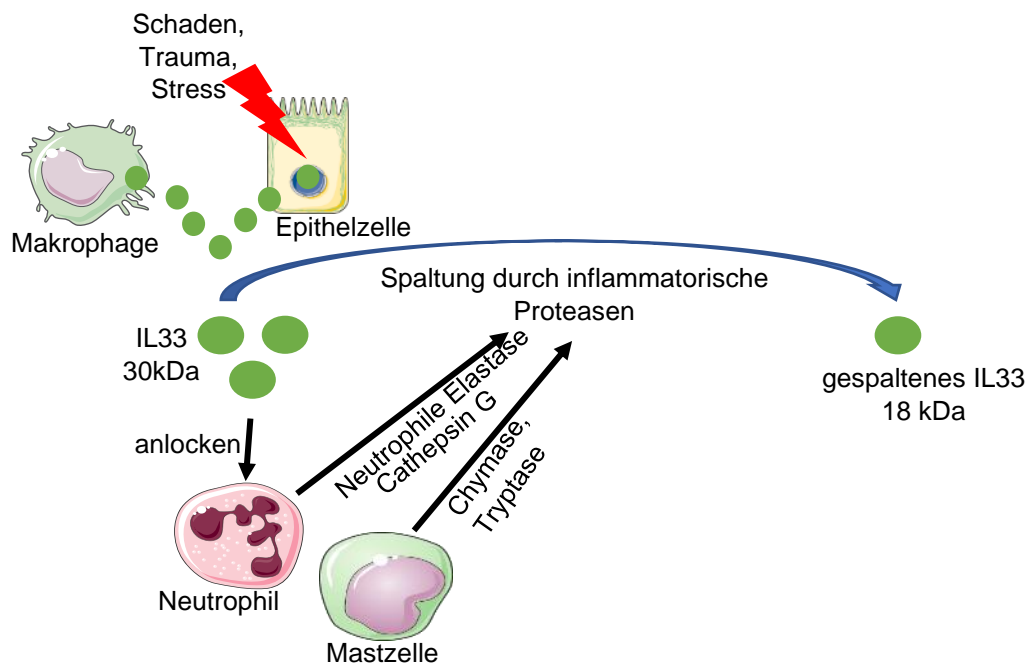


Abb. 4: Wenn IL33 durch Makrophagen oder geschädigtes Gewebe ausgeschüttet wird, liegt es als *full length* IL33 mit einer Länge von 30 kDa vor. Das ausgeschüttete IL33 lockt Mastzellen und Neutrophile an, die mit Proteasen, wie der neutrophilen Elastase, Cathepsin G, Chymase oder Tryptase, in der Lage sind, das IL33 zu spalten. Dabei entsteht das gesplattene IL33 mit einer Länge von 18 kDa und einer bis zu 30-fach erhöhten Aktivität.

IL33 spielt eine Rolle in verschiedenen Erkrankungen, wie zum Beispiel Asthma (84), Rheumatoide Arthritis (85), Colitis (86) und in vaskulären Erkrankungen (87). In kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) scheint IL33 eine vorteilhafte Rolle in Bezug auf Gewebereparatur und Regeneration zu spielen. Das Level des sST2 hat bei diesen Erkrankung prognostischen Nutzen (78). Bei CVD geht aus verschiedenen Studien hervor, dass ein geringes IL33 und ein erhöhter sST2-Serumlevel mit erhöhter Schwere der Erkrankung einhergeht (88).

1.7.1 Interleukin 33 in der akuten Pankreatitis

In Patienten mit akuter Pankreatitis konnte gezeigt werden, dass sowohl IL33 als auch sST2 ansteigen (89). Das sST2-Level geht dabei mit der Schwere der Erkrankung einher (89). In Mäusen, in denen eine akute Pankreatitis mit Hilfe der Gangligatur induziert wurde, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass IL33 ansteigt (90). Kempuraj et al. zeigten 2013, dass IL33, ausgeschüttet von Azinuszellen, die Inflammation in der akuten Pankreatitis nach Gangligatur erhöht (90) und somit den Verlauf der Pankreatitis verschlechtert. IL33 hat zudem Einfluss auf die Mastzellaktivierung (91).

In ST2 knock-out Mäusen wurde gezeigt, dass ST2 wohl eine protektive Rolle während der akuten Pankreatitis hat. Ouziel et al. konnten 2012 zeigen, dass die Pankreatitis in ST2 knock-out Tieren einen schwereren Verlauf hatte, was zur Annahme führt, dass der ST2/IL33-Pathway eine protektive Rolle während der akuten Pankreatitis spielt (77).

Eine weitere Gruppe konnte zeigen, dass IL33 eine negative Rolle während der akuten Pankreatitis spielt (90). Die Gruppe um Samuel et al. konnte 2013 zeigen, dass IL33 zu einer Stimulation des pro-inflammatorischen Pathways der Azinuszellen führt und somit die Entzündungsreaktion in der akuten Pankreatitis erhöht (90).

Samuel et al. nahmen Stellung zu den Daten der Gruppe um Ouziel und sagten, dass die gegenläufigen Ergebnisse damit begründet werden können, dass Mäuse mit einem ST2 knock-out von Geburt an einen Phänotyp manifestieren, der auf der Abwesenheit von IL33 basiert. Während der Entwicklung der Tiere kommt es dadurch bereits zu einer Dysregulation in der Gewebeheilung, was zu erhöhter Schädigung als Folge von Immunreaktionen führt (90).

1.8 Therapie der akuten und chronischen Pankreatitis

Kommt ein Patient mit akuter Pankreatitis in die Klinik, wird dieser engmaschig gemonitort, um Komplikationen rechtzeitig zu erkennen, und erhält unterstützend eine intravenöse Gabe von Flüssigkeit und Medikamenten und zusätzlich Sauerstoff. Der Zustand der meisten Patienten wird unter dieser Therapie innerhalb einer Woche besser, ohne ernsthafte Komplikationen zu entwickeln.

Als Therapie der chronischen Pankreatitis gibt es verschiedene Ansätze. Es gibt den Ansatz der konservativen Therapie, bei der auf eine Umstellung des Lebensstils gebaut wird und den Patienten nahegelegt wird, mit dem Rauchen und Trinken aufzuhören und die Ernährung umzustellen. Zudem werden Schmerzmittel gegeben (92).

Als weitere Option gibt es sowohl in der chronischen als auch in der mit Komplikationen einhergehenden akuten Pankreatitis die endoskopische Therapie, bei der den Patienten ein Stent eingesetzt wird. Dieser Stent wird eingesetzt, um den intraductalen Druck zu reduzieren, Steine zu entfernen und Pankreasgangdisruptionen zu vermeiden (93). Als weitere Option, die chronische Pankreatitis zu behandeln, gibt es den operativen Eingriff. Dafür gibt es unterschiedliche Indikatoren, wie z.B. Schmerzen, mechanistische Einschränkungen, pankreatische Komplikationen, Zysten oder Malignität (15). Als Operationsmöglichkeiten gibt es verschiedene Drainage- und Resektionsansätze. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass ein Maximum an funktionellem Gewebe erhalten wird, das inflammatorische Gewebe entfernt wird, das Gangsystem gut drainiert ist und es zu keiner Verletzung der anderen Gänge kommt (15).

Neben den beschriebenen Therapieoptionen gibt es aktuell keinen Marker, der vorhersagen kann, ob der Verlauf der akuten Pankreatitis schwer oder mild sein wird. Zudem gibt es keine Therapie, die das Immunsystem mit einbezieht. Das Immunsystem während der akuten Pankreatitis ist bislang nicht gut erforscht.

2. Fragestellung

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie der Organschaden in Lunge und Niere während der akuten Pankreatitis entsteht, welche Rolle IL33 in der schweren akuten Pankreatitis spielt und wie es den Organschaden während der akuten Pankreatitis beeinflusst. Der Einfluss von IL33 auf Monozyten und Makrophagen und somit auf den Organschaden wurde im Besonderen untersucht, um den Einfluss dieses Zytokins zu verstehen. Eine zusätzliche Frage war, ob IL33 als therapeutische Option in Frage kommen kann und ob die Manipulation dieses Zytokins den Prozess dieser Erkrankung beeinflussen kann. Dazu wurden verschiedene Tiermodelle gewählt. Zunächst wurden Wildtypmäuse mit rekombinantem sST2 behandelt, um die Wirkung von IL33 als Zytokin zu blocken und somit den Einfluss auf die Immunzellen zu reduzieren bzw. zu unterdrücken. Anschließend wurden IL33 knock-out Mäuse untersucht, um IL33 nicht nur als Zytokin zu blocken, sondern ebenso als Transkriptionsfaktor.

Wie entsteht der Organschaden in Lunge und Niere während der akuten Pankreatitis und welchen Einfluss hat das Zytokin IL33? Kann die Manipulation dieses Zytokins therapeutisch genutzt werden?

3. Methoden

3.1. *In vitro* Modelle

Für die *in vitro* Experimente wurden Makrophagen aus dem Knochenmark von Wildtypmäusen isoliert (*bone marrow derived macrophages* – BMDM) und mit LPS oder Azinuszellen inkubiert. Für weitere Analysen wurden entweder die Zellen oder der Überstand weiterverarbeitet.

3.2. Makrophagen und Azinuszellen in Zellkultur

3.2.1 Makrophagenisolation

Die Makrophagen (*bone marrow derived macrophages* – BMDM) wurden aus dem Knochenmark von Wildtypmäusen isoliert und in Zellkultur genommen. Dafür wurden die Knochen der Hinterläufe der Tiere freipräpariert und Femur und Tibia isoliert. Das Knochenmark wurde mit einer Kanüle und PBS aus dem Knochen gespült und in ein 70 µm Sieb überführt. Das Knochenmark wurde mit der glatten Seite eines Spritzenstempels zerrieben und mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen bei 1400 rpm, 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml RPMI Medium mit 5% FCS und 1 % Penstrep (Penicillin Streptavidin) aufgenommen. Es wurden 9 ml Medium in 10 cm Schalen vorgelegt und es wurde je 1 ml Zellsuspension hinzugegeben. Nach 6 Stunden wurde das Medium vorsichtig abgenommen und es wurde neues Medium, mit 20 ng/ml M-CSF als Wachstumsfaktor für Makrophagen auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis die Makrophagen nach 5 bis 7 Tagen konfluent waren.

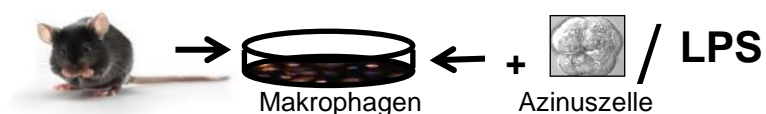
3.2.2 Azinuszellisolation

Für die Azinuszellisolation wurde zunächst Medium angesetzt. Dafür wurde DMEM *high glucose* Medium mit HEPES, BSA und PenStrep versetzt. Das Medium wurde mit Salzsäure angesäuert und mit Sauerstoff versetzt.

Je Pankreas wurde ein Kolben mit 6 ml Medium und 0,5 mg Kollagenase befüllt. Diese wurden bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Pankreata wurden isoliert und in die Kolben gegeben. Mit einer Schere wurde das Gewebe zerkleinert und anschließend im Wasserbad bei 100 rpm für 15 min inkubiert. Das Fettgewebe wurde vorsichtig abgekippt und es wurden erneut 6 ml Medium mit 0,5 mg Kollagenase auf das Gewebe gegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min bei 37°C. Das Gewebe wurde mehrfach auf und ab pipettiert und über ein Sieb in ein 15 ml Falcon überführt. Nach einer Zentrifugation von 1,5 min bei 1800 rpm wurde das Pellet in neues Medium aufgenommen und erneut filtriert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in Medium aufgenommen und für 20 min mit 0,001 mM CCK (Cholecystokinin) versetzt. Durch die CCK Stimulation wurden die Rezeptoren der Azinuszellen übermäßig aktiviert, was zu einer Inhibierung des Proteasetransports aus der Zelle und somit zur Aktivierung der Proteasen in der Zelle und zur Nekrose führte.

3.2.3 Co-Inkubation von Makrophagen und Azinuszellen oder LPS

Die CCK-stimulierten Azinuszellen oder LPS wurden zu den konfluent gewachsenen Makrophagen gegeben und für 6 Stunden inkubiert. Die Azinuszellen und das LPS wurden mit PBS abgespült und die Makrophagen wurden für Transkriptomanalysen präpariert.



3.2.4 Transkriptomanalysen von Makrophagen

Microarray basierte Transkriptomanalysen wurden mit der aus den Makrophagen gewonnenen RNA von der Gruppe der funktionellen Genomforschung um Herrn Professor Völker und Herrn Dr. Homuth durchgeführt. Dafür wurden die Makrophagen mit einem Zellschaber und Trizol von der Schale gelöst und die RNA wurde aus den Zellen isoliert und durch die Methode des Affymetrix Gene Chip Mouse Gene 2.0 Array analysiert. Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der RosettaResolver Software (Rosetta Bio Software, Seattle, WA) durchgeführt.

3.2.5 Sandwich-ELISA für IL33 aus Überständen

Als weiterer Nachweis, welche Zellen IL33 exprimieren, wurde ein IL33 Sandwich ELISA durchgeführt. Zunächst wurden Makrophagen erneut aus dem Knochenmark isoliert und für eine Woche mit M-CSF bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden Azinuszellen isoliert und zu den Makrophagen gegeben. Als Kontrollen dienten Makrophagen und Azinuszellen allein. Nach 2, 4 und 6 Stunden wurde das Medium entnommen und der ELISA wurde durchgeführt.

Zunächst wurde die Platte mit dem Fangantikörper bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Platte für 3 Stunden mit *Reagent Diluent* blockiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen. Um die Messung anschließend auswerten zu können, wurde neben den Proben eine Standardreihe pipettiert. Die Proben und der Standard wurden abgedeckt für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Platte wurde anschließend gewaschen. Der Detektionsantikörper wurde auf die Platte pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine Lösung mit Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*) hinzugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Streptavidin bindet das am Fangantikörper gekoppelte Biotin und kann über die HRP detektiert werden. Nach einem

weiteren Waschschrift wurde die Substratlösung hinzugegeben und für 20 min inkubiert. Bei der Substratlösung handelt es sich um ein Substrat, das von der HRP umgesetzt wird und es zu einem Farbumschlag kommt. In diesem Fall handelt es sich um Tetramethylbenzidin, das von der Peroxidase aktiviert wird und sich blau färbt. Die Substratumsetzung wird durch die schwefelhaltige Stopplösung (2 N H₂SO₄) beendet und es kommt zu einem Farbumschlag ins Gelbe. Die Platte kann im Photometer bei 450 nm gemessen werden.

3.3. β -Galactosidase-Detektion

Die β -Galactosidase-Detektion wurde mit Hilfe des chromogenen Substrates X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) durchgeführt. Das Enzym β -Galactosidase, das in den IL33-/- Mäusen an Stelle von IL33 exprimiert wird (siehe 5.2 IL33 knock-out Modell) hydrolysiert X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl (5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol). Das 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird vom Sauerstoff der Luft zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert.

Zunächst wurden aus in TissueTec eingebetteten und in flüssigem Stickstoff gefrorenen Organen 10 μ m Schnitte angefertigt oder Zellen aus Zellsuspension wurden in Chamber Slides überführt. Durch eine Fixierungslösung wurde das Gewebe/die Zellen 10 min bei Raumtemperatur fixiert (LacZ tissue staining Kit, Merck). Anschließend wurde dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Färbelösung, die X-Gal enthielt, wurde frisch angesetzt und die Zellen/das Gewebe wurde über Nacht bei 37 °C gefärbt. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop dargestellt. Um das Gewebe darzustellen, wurden die Schnitte zunächst für eine Minute mit Eosin gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte für je 20 Sekunden in 70 %-iges, 95 %-iges und 100 %-iges Ethanol getaucht. Nachdem diese für 5 min in Xylol inkubiert wurden, wurden sie in VectaMount Eindeckelmedium eingedeckelt und anschließend im Mikroskop dargestellt.

3.4. *In vivo* – Pankreatitismodelle

Für *in vivo* Experimente wurden die Wildtypmäuse von Charles River bestellt (Sulzfeld, Deutschland). Vor Beginn der Experimente saßen sie eine Woche im Tierstall. Es wurden männliche Wildtypen im Alter von 8-12 Wochen verwendet. Zusätzlich wurden IL33-/- (knock-out) Tiere aus der Zucht in der Pathologie verwendet. Diese waren ebenfalls 8-12 Wochen alt.

3.4.1 Gangligatur – schwere akute Pankreatitis

Die schwere akute Pankreatitis wurde durch eine Gangligatur des Pankreasganges induziert. Dafür wurden die Mäuse mit PBS+ Ketamin+ Xylazin narkotisiert (10 µl je Gramm Körpergewicht). Um zu testen, ob die Mäuse narkotisiert waren, wurden die Reflexe durch Kneifen in die Hinterläufe getestet. Die Mäuse wurden in Rückenlage operiert. Zunächst wurde der Bauch mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert. Der Bauchraum wurde unterhalb des Zwerchfells geöffnet, ohne dieses zu verletzen. Mit Hilfe eines mit PBS befeuchteten Wattestäbchens wurde die Leber zurückgehalten und die hintere Darmschlinge wurde mit einer Pinzette hervorgezogen. Der Pankreasgang wurde mit einem doppelten Knoten ligiert. Anschließend wurde der Darm mit dem befeuchteten Wattestäbchen zurückgeschoben und die Bauchhöhle wurde mit Hilfe einer fortlaufenden Naht vernäht. Die Tiere erhielten als Schmerzmittel Trinkwasser mit 1 % Mitamizol und mit diesem Wasser angefeuchtetes Futter am Boden des Käfigs.

An Tag 2 nach Gangligatur wurde den Tieren 50 mg/kg Körpergewicht Caerulein i.p. injiziert, um die Erkrankung in den Tieren anzugleichen. An Tag 3 nach Gangligatur wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Organe wurden entnommen.

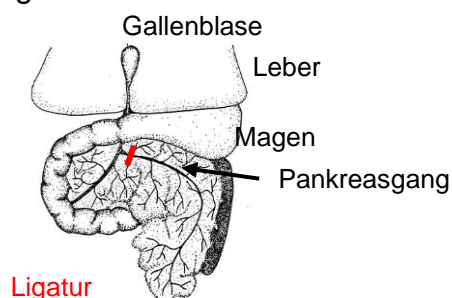


Abb. 5: Darstellung des Pankreas und anderer Organe der Maus. In Rot ist die Ligatur zu sehen, die den Tieren zugefügt wird, um eine schwere akute Pankreatitis zu induzieren.

3.5. Mausmodelle

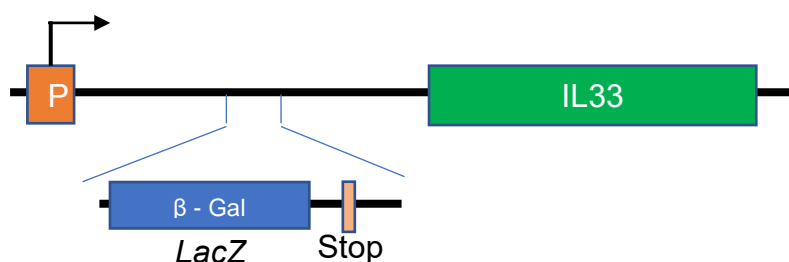
3.5.1 sST2-Modell

Um zu testen, welche Rolle IL33 als Alarmin während der akuten Pankreatitis spielt, wurden Mäuse mit sST2 behandelt. sST2 ist ein löslicher Rezeptor, der IL33 bindet. Kommt dieser in einer hohen Dosis in der Maus vor, fängt dieser das IL33 von den Zellen weg und bewirkt somit, dass das IL33 nicht mehr an den Membran gebundenen Rezeptor bindet und eine geringe bis keine Wirkung mehr auf die Immunzellen hat.

50 µg sST2 wurde einen und zwei Tage nach der Gangligatur i.p. injiziert. An Tag 2 erhielten die Tiere zusätzlich 50 mg/kg Körpergewicht Caerulein. An Tag 3 nach Ligatur wurden die Tiere getötet und die Organe wurden entnommen.

3.5.2 IL33 knock-out Modell C57BL/6:IL-33–LacZ Gt mice (IL-33Gt)

Um zu untersuchen, welchen Effekt IL33 während der akuten und chronischen Pankreatitis als Alarmin und Transkriptionsfaktor hat, wurde das Gangligatur Modell an IL33 knock-out (C57BL/6:IL-33–LacZ Gt mice (IL-33Gt)) Tieren durchgeführt. Im Weiteren werden die Tiere als IL33-/- bezeichnet. Diese Tiere sind genetisch so modifiziert, dass Zellen, die IL33 exprimieren, an dieser Stelle kein IL33 mehr produzieren, sondern β -Galactosidase. Bei diesen Tieren wurde in Intron 1 ein Insert (Gt Vektor 76) eingefügt, das ein Stopcodon für IL33 enthält und das LacZ Gen, das für die β -Galactosidase Produktion verantwortlich ist.

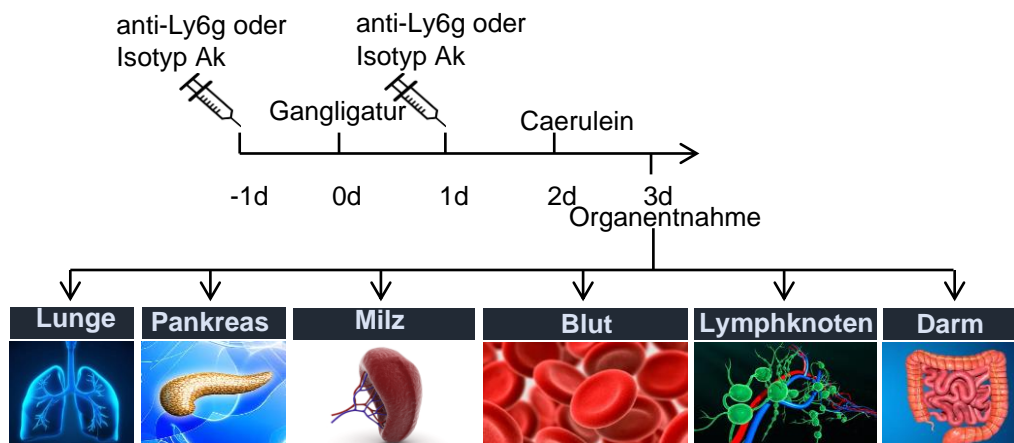


Dieses Modell kann verwendet werden, um Zellen, die IL33 produzieren zu visualisieren. Dafür werden die Zellen mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-

β -D-galactopyranosid) inkubiert. Das Enzym β -Galactosidase hydrolysiert X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl (5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol). Das 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird vom Sauerstoff der Luft zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert.

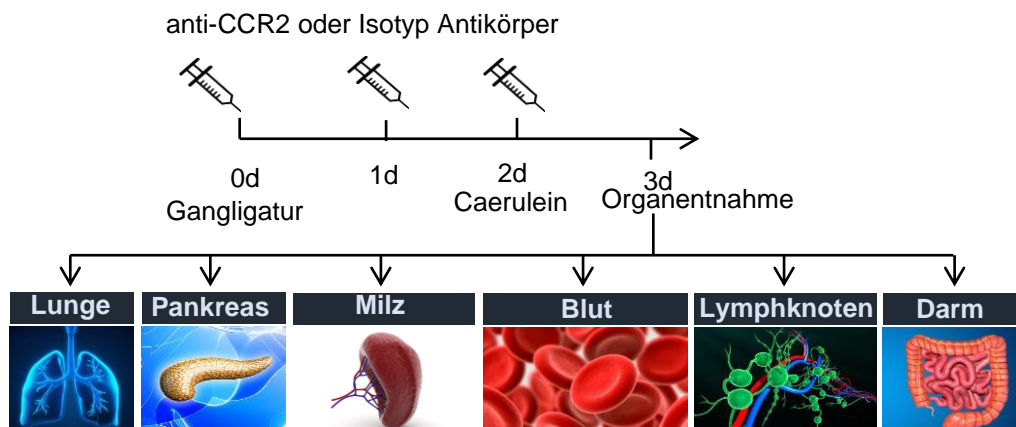
3.5.3 Neutrophilen-Depletion in Wildtypmäusen

Es ist bekannt, dass Neutrophile während der akuten Pankreatitis in Pankreas und Lunge einwandern und einen Schaden verursachen können. Um zu überprüfen, ob diese verantwortlich für die Schwere der Pankreatitis oder den Organschaden in Lunge und Niere sind, wurden Neutrophile mit Hilfe eines Anti-mouse-Ly6G-Antikörpers von BioXCell blockiert. Eine Kontrollgruppe wurde mit dem Isotypen IgG2a des Antikörpers behandelt. Der Antikörper und Isotyp wurden einen Tag vor und einen Tag nach Gangligatur mit 200 μ g in 200 μ l induziert. An Tag 2 wurden die operierten Tiere mit 50 mg/kg Körpergewicht Caerulein behandelt und die Organe wurden an Tag 3 nach zervikaler Dislokation entnommen. Die Ergebnisse der Gruppen wurden verglichen und analysiert.



3.5.4 Monozyten-Depletion in Wildtypmäusen

Um zu überprüfen, ob Monozyten einen Effekt auf den Organschaden während der akuten Pankreatitis haben, wurden diese mit Hilfe des anti-mouse-CCR2-Antikörpers MC-21 blockiert. Eine Kontrollgruppe wurde mit dem Isotypen IgG2b des Antikörpers behandelt. Der Antikörper und Isotyp-Antikörper wurden am Tag der Gangligatur und an den beiden folgenden Tagen mit 20 µg in 200 µl induziert. An Tag 2 wurden die Tiere mit 50 mg/kg Körpergewicht Caerulein behandelt und an Tag 3 wurden die Organe nach zervikaler Dislokation entnommen.



3.6. Organentnahme

Das Blut wurde mit einer Kapillare vom retrobulbären venösen Plexus entnommen und in ein Serumröhrchen überführt. Anschließend wurde die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und der Bauchraum der Tiere wurde eröffnet. Pankreas und Lunge der Tiere wurden entnommen und mit PBS gespült. Ein Teil des Organs wurde in 4,5% Formaldehyd für die Paraffineinbettung fixiert, ein Teil wurde in TissueTec eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei minus 80°C gelagert und ein Teil wurde direkt für MPO Analysen oder RNA Isolation in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Milz wurde entnommen und für FACS-Analysen weiterverarbeitet. Lymphknoten wurden ebenfalls in TissueTec überführt und schockgefroren. Der Darm wurde mit PBS gespült, längs aufgeschnitten, um ein Wattestäbchen gewickelt (Swiss Roll) und in TissueTec eingebettet und schockgefroren. Eine Niere wurde für die Paraffineinbettung in Formaldehyd fixiert und die andere Niere wurde für Genanalysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.6.1 Blut

Das Blut wurde bei 5000 rpm 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum für Amylase und Lipase Analysen 1:50 verdünnt. 30 µl wurden bei -80 °C weggefroren um anschließend den Kreatinin ELISA durchzuführen.

3.6.1.1 Amylase- und Lipase-Messung

Während der Pankreatitis kommt es zur Schädigung des pankreatischen Gewebes. Dabei werden Enzyme, die unter physiologischen Bedingungen nicht ins Blut, sondern als Verdauungsenzyme in den Darm abgegeben werden, auf Grund des Schadens ins Blut freigesetzt und können gemessen und als Schwereindikator verwendet werden. Um einen pankreatischen Schaden zu diagnostizieren werden die Serumamylase und Serumlipase bestimmt.

3. Methoden

Amylase und Lipase wurden mit einem Colori-metric Assay von Roche/Hitacho gemessen. Diese Assays basieren auf einer kinetischen Bestimmung. Dabei wird die Aktivität der Enzyme über einen Farbumschlag der Messsuspension bestimmt. In dieser Suspension befinden sich eine definierte Menge von Oligosacchariden und Lipiden, die während der Messung von Amylase und Lipase verdaut werden. Dies führt zur Veränderung der Farbintensität, welche die Aktivität der Enzyme bestimmt.

Die beiden Enzyme wurden auf einer 96 Well Platte gemessen. Dafür wurden je Probe Triplikate bestimmt. Für jede Probe wurden 10 µl verdünntes Serum und 90 µl der Messlösung des Kits auf die Platte gegeben. Lipase wurde bei 570 nm und 37 °C und Amylase bei 405 nm und 37 °C gemessen.

3.6.1.2 Kreatinin-ELISA von Serumproben

Zusätzlich wurde in den Serumproben Kreatinin mittels ELISA gemessen. Diese Messung wurde vorgenommen, um die Tiere auf einen Nierenschaden zu untersuchen. Kreatinin ist ein harnpflichtiges Stoffwechselprodukt, das über die Niere ausgeschieden wird. Kommt es zu einer Erhöhung des Kreatininwertes im Serum, kann das ein Zeichen für einen Nierenschaden sein.

Für die Bestimmung wurde ein ELISA von LSBio verwendet. Das Besondere an diesem ELISA ist das Wettbewerbsprinzip des Antigens. Die Platte ist vorbehandelt mit dem Zielantigen. Werden nun das Serum und der Detektionsantikörper hinzugegeben, konkurrieren die Antigene auf der Platte mit denen im Serum um die Bindung des Antikörpers. Je mehr Antigene im Serum sind, desto weniger Detektionsantikörper binden an die Platte. Im Weiteren bedeutet dies, dass in der Auswertung höhere OD Werte für eine geringere Antigenkonzentration im Serum sprechen.

Zunächst wurde die Platte zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 50 µl Standard oder Probe beladen. Der Biotin-Detektions-Antikörper wurde direkt hinzupipettiert und die Platte wurde für

45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. Das HRP Streptavidin Konjugat wurde hinzupipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Streptavidin bindet das am Detektions-Antikörper gebundene Biotin. Nach weiteren Waschschritten wurde das TMB Substrat für 10 min hinzugegeben und ebenfalls bei 37 °C inkubiert. Das TMB Substrat reagiert mit dem am Streptavidin gebundenen HRP und es kommt zur Farbreaktion. Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Stopplösung hinzugegeben. Anschließend wurde der ELISA bei 450 nm gemessen. Die Daten wurden mittels Standardkurve ermittelt und bei GraphPad dargestellt.

3.6.2 Pankreas und Lunge

3.6.2.1 H&E-Färbung

Die Einbettung in Paraffin erfolgte für die H&E-Färbung. Durch eine Hämatoxylin- und Eosin-Färbung ist es möglich Gewebestrukturen mikroskopisch zu identifizieren und zu analysieren. Hämatoxylin färbt dabei basophile/saure Strukturen blau (Zellkern – DNA und ER) und Eosin färbt die acidophilen/basischen Strukturen (Plasma, Kollagen) rot an. Dadurch ist eine Visualisierung und Analyse des Schadens möglich.

Für die H&E-Färbung wurden zunächst 3 µm Schnitte angefertigt. Diese wurden über Nacht bei 37 °C gelagert, damit sich das Gewebe auf dem Objektträger grade zieht und trocknet. Für die Färbung wurden die Schnitte in ein Färbeschiffchen sortiert und für die Entparaffinierung zunächst für 10 min in Xylol, 5 min in Ethanol, erneut 10 min in Xylol, 5 min in Methanol, 5 min in 100 %-igen Alkohol, 5 min in 95 %-igen Alkohol, 5 min in 70 %-igen Alkohol und 5 min in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min Hämatoxylin gefärbt und danach für 2 min unter fließendem Wasser gespült. Die Gegenfärbung im Eosin erfolgte für 1 min. Um die Färbung zu fixieren wurden die Schnitte für jeweils 30 Sekunden in 70 %-igen Ethanol, in 95 %-igen Ethanol und in 100 %-igen Ethanol geschwenkt. Zum Schluss wurden diese für 5 min in Xylol inkubiert und in DABKO Eindeckelmedium

engedeckelt. Zum Trocknen wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert. Die Visualisierung erfolgte im Slidescanner. Anschließend wurde die Infiltration des Gewebes mit der Pattern-Analyse-Software des Quant-Centers (QC) von Sysmex bestimmt und in GraphPad dargestellt.

3.6.2.2 Immunhistochemische Färbung (IHC)

Um spezifische Zelltypen und Strukturen im Lungengewebe nachzuweisen, wurden immunhistochemische (IHC) Färbungen angefertigt. Bei einer IHC werden strukturspezifische Primär-Antikörper eingesetzt, die die zu untersuchende Struktur binden. Anschließend bindet an den Primärantikörper ein Sekundärantikörper, der ein Detektionssystem gebunden hat. In diesem Fall handelt es sich um Horseradish Peroxidase (HRP), die durch eine nachfolgende Reaktion mit der Substratlösung sichtbar gemacht werden kann. Bei der Substratlösung handelt es sich um ein Substrat, welches von der HRP umgesetzt werden kann und es zu einem Farbumschlag kommt. In diesem Fall handelt es sich um Diaminobenzidin (DAB). DAB wird durch die HRP oxidiert und bildet ein in wässrigen und organischen Lösungsmitteln unlösliches Präzipitat brauner Farbe, das im normalen Licht detektiert werden kann und nicht ausbleicht.

Für die IHC wurden zunächst 3 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, die entparaffiniert wurden. Sie wurden in Färbeschiffchen zunächst für 10 min in Xylol, 5 min in Ethanol, erneut 10 min in Xylol, 5 min in Methanol, 5 min in 100 %-igen Alkohol, 5 min in 95 %-igen Alkohol, 5 min in 70 %-igen Alkohol und 5 min in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in Färbecontainer mit DACO Antigenretrieval Puffer (1:10) sortiert und im Dampfdrucktopf für 30 min gekocht. Nach 30 min wurden die Schnitte in PBS abgekühlt und anschließend 20 min mit 3 % H₂O₂ geblockt. Danach wurden die Schnitte mit PBS gewaschen (4x10 min). Nach einem weiteren einstündigen Blockschrift mit 20% FCS in PBS, wurden die Gewebe auf den Schnitten mit einem Fettstift umrandet und der Primärantikörper wurde auf die Schnitte gegeben. Dieser wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschriften á 10 min in PBS wurde der Sekundärantikörper auf den

Schnitt gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit PBS wurde die DAB Lösung angesetzt (5 ml A.dest, 2 Tropfen Puffer, 2 Tropfen H₂O₂, 4 Tropfen DAB) und die Schnitte wurden mit dieser behandelt, bis unter dem Mikroskop eine deutliche Braunfärbung zu sehen war. Die Reaktion wurde mit A.dest abgestoppt und die Schnitte wurden erneut in PBS gewaschen. Anschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin vorgenommen. Die Schnitte wurden 5 min in diesem inkubiert und anschließend je eine Minute durch eine Alkoholreihe (70 %, 95 %, 100 %) geführt. Zum Schluss wurden die Schnitte 5 min in Xylol inkubiert und anschließend in VectaMount Eindeckelmedium eingedeckelt.

3.6.2.3 MPO – Myeloperoxidase-Messung

Es ist bekannt, dass während der Pankreatitis Neutrophile in die Lunge einwandern, die einen Schaden verursachen. Um diesen Schaden zu messen, wird die Myeloperoxidase in den Lungen bestimmt. Die Menge der MPO steht für die Menge der eingewanderten Neutrophilen und somit für die Schwere des verursachten Schadens. Dabei wird eine photometrische Messung durchgeführt. In der Messung wird sich zu Nutzen gemacht, dass MPO die Reaktion von Hydrogenperoxid mit freiem Chlor zu Hypochloridsäure (HOCL) katalysiert. Dieses befindet sich in der Messsuspension und wird durch vorhandenes MPO umgewandelt. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag, der gemessen werden kann. Die Intensität der Farbe wird dabei indirekt als Maß für die MPO genommen.

Für die MPO-Analyse wurde ein in flüssigem Stickstoff gefrorener Lungenflügel mit 500 µl Homogenisierungspuffer im Douncer homogenisiert. Anschließend wurden 100 µl für die Proteinbestimmung entnommen und 2x 10 sec geschallt (Ultraschall). Die 400 µl wurden in ein Eppie überführt (MPO Bestimmung). Anschließend wurden alle Proben für 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Für die Proteinbestimmung wurde eine 1:200 Verdünnung hergestellt und die Proben wurden bei -20 °C gelagert. Das Pellet für die MPO-Bestimmung wurde in 500 µl

3. Methoden

Extraktionspuffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend erfolgten 4 Zyklen mit einfrieren, auftauen (Heizblock 37°C) und resuspendieren, um die MPO freizusetzen. Die Proben wurden nach dem letzten Auftauen zweimal für 10 sec geschallt und anschließend 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Für die Messung wurde eine 1:5 Verdünnung hergestellt. Die Messung der Proben erfolgte im Plattenreader bei 30 °C und einer Wellenlänge von 460 nm. Es wurde ein Substrat aus dem Messpuffer aus H₂O₂ und o-Dianisid angesetzt. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung mit 10 µl Probe und 90 µl Substrat. Die Messung war eine Kinetik über 10 min. Zusätzlich wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Ergebnisse der MPO wurden mit dem Proteingehalt gegengerechnet.

3.6.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wird als Bradfordreagent der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) verwendet, der in saurer Lösung Komplexe mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen bildet. Diese Komplexe können bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden. Um die Daten auszuwerten, wird stets eine Standardreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen von BSA mitgeführt.

Für die Bestimmung wurde die gewonnene Proteinlösung in einer Verdünnung von 1:200 in destilliertem Wasser auf die 96-Well-Platte aufgetragen. Die Proben wurden jeweils als Triplikate mit 10 µl Proteinlösung und 190 µl 1:5 Bradfordreagent aufgetragen und am Photometer bei 595 nm gemessen. Anschließend wurde die Konzentration mit Hilfe der Standardreihe ermittelt.

3.6.3 Monozytenisolation aus der Lunge für die Real-Time-Deformability-Cytometry (RT-DC)

Um die Größe und Deformation der Monozyten in der Lunge zu untersuchen, wurde zunächst die Lunge entnommen und Zellen wurden mittels *Lung Dissociation Kit* isoliert. Aus diesen Zellen wurden mit Hilfe eines Monozyten Isolationskit die Monozyten isoliert. Diese wurden anschließend im RT-DC gemessen und analysiert.

3.6.3.1 Zellisolation aus der Lunge (Lung Dissociation Kit)

Zunächst wurde die Lunge entnommen und in einzelne Lungenlobuli geschnitten. Anschließend wurden diese in den vorbereiteten Enzymmix in ein C-Tube gegeben und mittels *gentleMacs Dissociator* zerkleinert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde das C Tube erneut im *gentleMACS Dissociator* eingespannt und das Gewebe wurde weiter zerkleinert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurde die Probe über ein 70 µm Sieb gegeben und in einem 15 ml Tube aufgefangen. Das Sieb wurde mit 1x Puffer S gespült. Anschließend wurde die Probe bei 300 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet wurde in entsprechendem Puffer aufgenommen.

3.6.3.2 Monozytenisolation

Die Monozyten wurden mittels Monozyten-Kit aus den Lungenzellen isoliert. Dazu wurden die Zellen in 1×10^8 Zellen/ml PBS aufgenommen und mit 50 µl/ml Rattenserum für 5 min inkubiert. Anschließend wurde ein Cocktail aus 1:1 Komponente A und B hinzugegeben (100 µl/ml Probe). Dieser wurde für 5 min bei 2-8 °C inkubiert. Die Beads wurden für 30 sec gevortext und mit 75 µl/ml Probe hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 3 min bei 2-8 °C wurde das Volumen mit PBS auf 2 ml aufgefüllt und die Probe wurde dreimal resuspendiert. Das Tube wurde in einem Magneten platziert und für 3 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und

in ein neues Tube überführt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Die aufgereinigten Monozyten wurden bei 300 x g für 6 min abzentrifugiert und in 500 µl Messpuffer aufgenommen. Anschließend wurden sie im RT-DC gemessen.

3.6.3.3 Real-Time-Deformability-Cytometry (RT-DC)

Die RT-DC Messung ist eine Methode für die mechanische Charakterisierung von Zellen. Zellen können in Form, Größe und Deformationsfähigkeit analysiert werden. Diese Methode basiert auf der hydrodynamischen Deformation der Zellen, die durch einen Mikrokanal kontaktfrei durch einen Flüssigkeitsstrom gezogen werden. Wenn die Zelle in diesen Kanal gezogen wird, deformiert sie sich. Jede Zelle wird visualisiert und gemessen. Mit der Software *ShapeOut* kann dann analysiert werden, welche Deformations- und Materialeigenschaften diese besitzt (94). Die Messungen wurden von Doreen Biedenweg aus der Arbeitsgruppe um Oliver Otto durchgeführt.

3.6.4 Splenozytenisolation aus der Milz

Die Isolation der Splenozyten erfolgte unmittelbar nach der Entnahme der Milz. Dazu wurde die Milz mit der glatten Seite eines 2 ml Spritzenstempels durch ein 70 µm Sieb zerrieben und mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit PBS auf 20 ml aufgefüllt und bei 300 x g für 6 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS auf 20 ml aufgefüllt und bei 300 x g für 6 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellen wurden im CASY gezählt. Anschließend wurden 1 mio Zellen je Probe und Panel für die FACS Analyse zum Färben in ein FACS Tube überführt.

3.6.4.1 Splenozytenfärbung für FACS-Analysen

Für die Analyse im FACS wurden die Splenozyten mit Fluoreszenzantikörpern gefärbt, um die unterschiedlichen Zellpopulationen darzustellen. Dafür wurden die unterschiedlichen Oberflächenmarker und Transkriptionsfaktoren angefärbt. Es gab ein Panel für T-Zellen, MDSC (*Myeloid derived suppressor cells*) und ILCs (*Innate lymphoid cells*).

Zunächst wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und bei 300 x g, 6 min bei 4 °C zentrifugiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde das Pellet in 25 µl FACS Puffer mit Fc Block aufgenommen, gevortext und 5 min inkubiert. Anschließend wurden 25 µl des Mastermix mit den jeweiligen extrazellulären Antikörpern für das entsprechende Panel (siehe Tabelle 1, 3, 4) auf die Zellen gegeben und diese wurden 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen in 1 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Für die intrazellulären Marker mussten die Zellen zunächst permeabilisiert werden. Dafür folgte eine Permeabilisierung für 30 min bei 4 °C im Dunkeln (*Transcription Factor Staining Buffer Kit*, Miltenyi). Die Zellen wurden zentrifugiert und mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut in 25 µl FACS Puffer mit Fc Block (1:50) aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Mastermix (25 µl) der intrazellulären Marker (siehe Tabelle 2, 5) hinzugegeben und für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (PBS) wurden die Zellen in 150 µl FACS Puffer aufgenommen und gemessen. Die Proben wurden bis zur Messung auf Eis gelagert.

3. Methoden

Tab. 1: T-Zell Panel für FACS-Analysen – extrazelluläre Antikörper

Antigen	Farbstoff	Kanal im FACS	Konzentration
CD4	PE	YG582	1:50
CD25	PE Cy7	YG780	1:50
CD69	BV510	V525	1:50
CD8a	BV605	V585	1:50

Tab. 2: T-Zell Panel für FACS-Analysen – intrazelluläre Antikörper

Antigen	Farbstoff	Kanal im FACS	Konzentration
Gata3	BV421	V450	1:10
Tbet	PerCP/Cy5.5	B710	1:10
Rory t	Vio 515	B530	1:10
FoxP3	APC	R670	1:20

Tab. 3: MDSC Panel für FACS-Analysen

Antigen	Farbstoff	Kanal im FACS	Konzentration
CD4	BV650	V660	1:50
CD206	APC	R670	1:50
Ly6G	BV421	V450	1:50
Ly6C	BV605	V585	1:50
CD163	PE	YG582	1:50
CD62L	Alexa488	B530	1:50
CD11b	PerCP Cy5.5	B710	1:50

Tab. 4: ILC Panel für FACS Analysen – extrazelluläres Panel

Antigen	Farbstoff	Kanal im FACS	Konzentration
Lin Marker	Alexa 700	R710	1:50
CD90	BV605	V585	1:50
CD127	BV650	V660	1:50
CD45	PE	YG582	1:50

Tab. 5: ILC Panel für FACS Analysen – intrazelluläres Panel

Antigen	Farbstoff	Kanal im FACS	Konzentration
Ror yt	APC	R670	1:10
Tbet	PerCP Cy5.5	B710	1:10
Gata3	BV421	V450	1:10
FoxP3	Alexa 488	B530	1:20

3.6.4.2 Gating-Strategie der FACS-Analysen

Bei allen Panels wurden zunächst die Einzelzellen (Single Cells) mit Forward Scatter Area (FSC-A) gegen Forward Scatter High (FSC-H) gegatet (a). Der Forward Scatter gibt dabei das Volumen der Zellen an.

Für das T-Zell-Panel (siehe Abb. 6) wurden als nächstes die Lymphozyten mit FSC-A gegen Side Scatter Area (SSC-A) gegatet (b). Der Side Scatter gibt die Granularität der Zellen an. Anschließend wurden die CD4⁺ Zellen gegatet, um die T-Helferzellen zu bestimmen. (c). Dann wurden die Aktivierungsmarker der Zellen CD69 (d) und CD25 (e) gegatet. Diese wurden also Histogramm dargestellt. Um die T-Zellen differenzieren zu können, wurde auf die Transkriptionsfaktoren gegatet. Die regulatorischen T-Zellen sind dabei mit CD25 gegen FoxP3 gegatet (f) und sind als CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ charakterisiert. Th1-Zellen wurden mit tbet gegen Histogramm ausgewertet (g) und sind definiert als CD4⁺tbet⁺. Th2-Zellen sind hingegen CD4⁺Gata3⁺ und wurden mit Gata3 gegen Histogramm dargestellt (h).

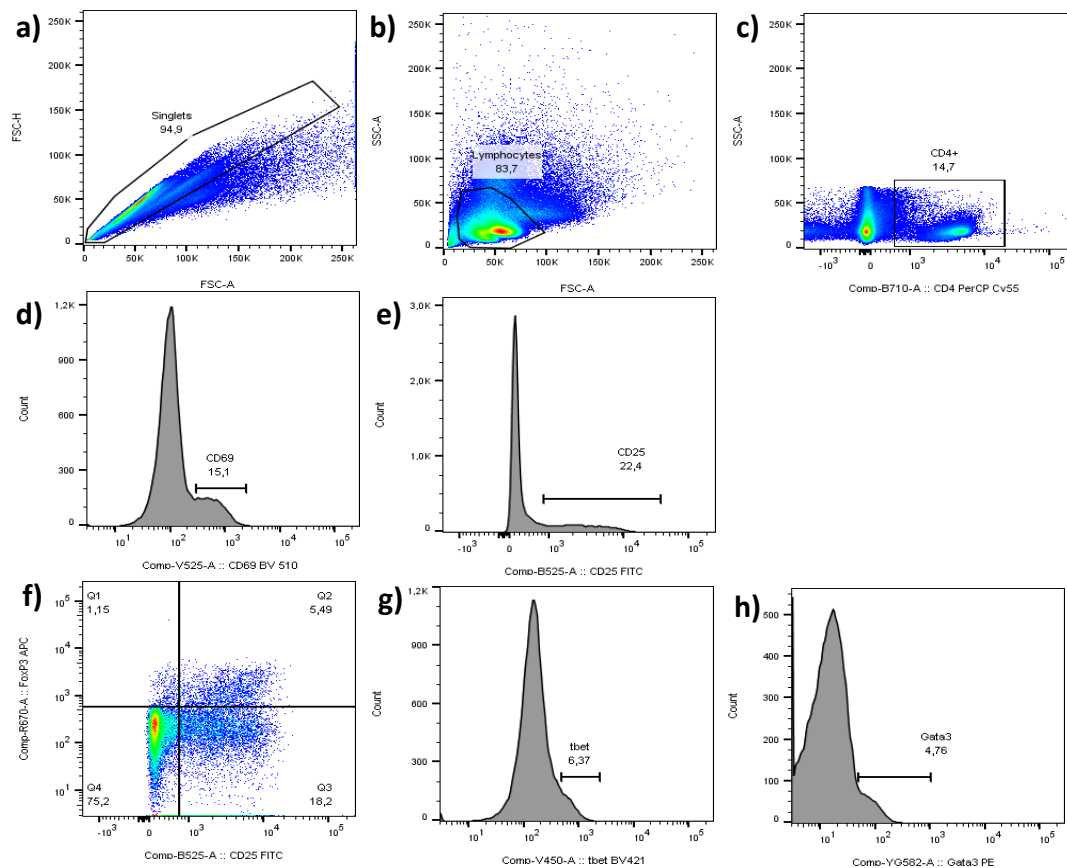


Abb.6: Gating Strategie für die T-Zellen. Splenozyten wurden isoliert, gefärbt und im FACS gemessen. Anschließend wurden die Daten mit FlowJo analysiert.

3. Methoden

Für das MDSC-Panel (Makrophagen) (siehe Abb. 7) wurden die Einzelzellen (a) weiter auf CD11b+ Zellen gegatet (b). Dafür wurde CD11b gegen SSC-A eingestellt (b). Anschließend wurden die Einzelzellen auf Ly6G+ Zellen gegatet (c). Dafür wurde Ly6G gegen SSC-A gegatet. Die CD11b+ Zellen wurden weiter auf CD163+ und CD206+ Zellen gegatet.

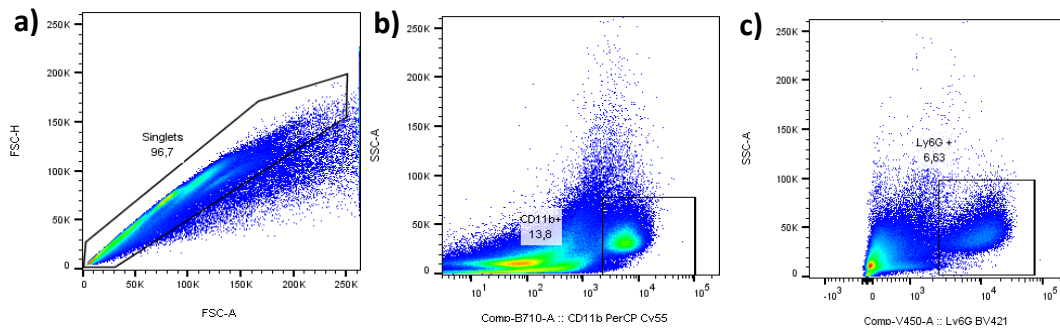


Abb. 7: Gating Strategie für MDSCs. Splenozyten wurden isoliert, gefärbt und im FACS gemessen. Anschließend wurden die Daten mit FlowJo ausgewertet.

Für das ILC-Panel (siehe Abb. 8) wurden zunächst die CD45+ Zellen gegatet (a), um die Lymphozyten darzustellen. Dafür wurde CD45 gegen SSC-A eingestellt. Anschließend wurden die Einzelzellen mit FSC-A gegen FSC-H dargestellt (b). Dann wurden die lineage negativen und CD127+ Zellen mit lin gegen CD127 dargestellt (c) und weiter auf CD90+ Zellen mit CD90 gegen CD45 gegatet (d). ILCs sind charakterisiert als CD45+lin-CD90+CD127+ Zellen. Um den ILC2-Subtypen der ILCs darzustellen wurde auf die Transkriptionsfaktoren gegatet. Dafür wurden Gata3 (e) gegen SSC-A eingestellt und die positiven Zellen wurden gegatet.

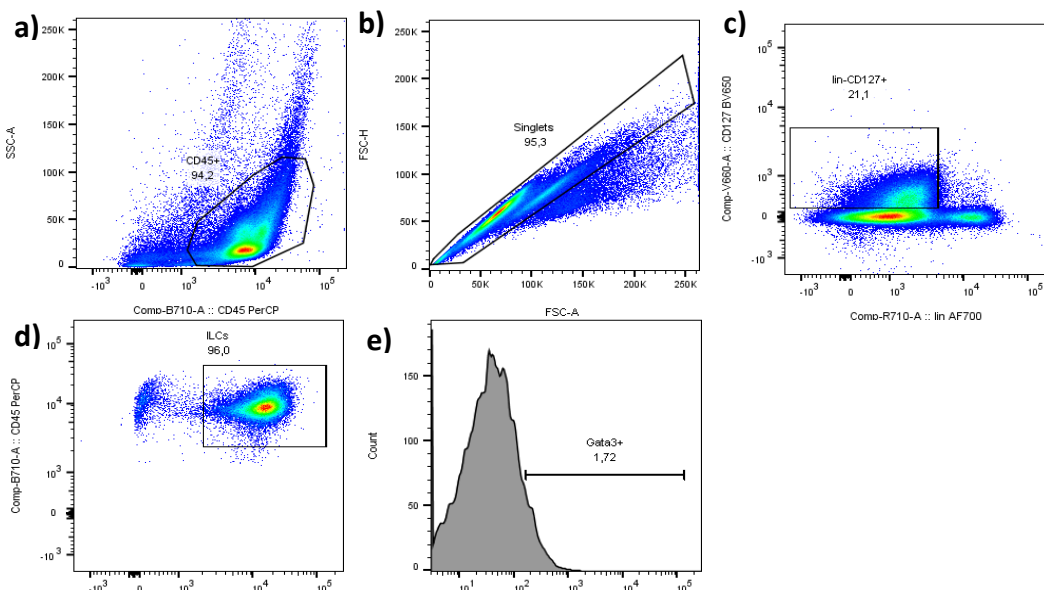


Abb. 8: Gating Strategie für ILCs. Splenozyten wurden isoliert, gefärbt und im FACS gemessen. Anschließend wurde die Daten mit FlowJo ausgewertet.

3.7. Genanalysen von Organen

3.7.1 RNA-Isolation

RNA-Analysen wurden von schock gefrorenem Gewebe durchgeführt. Dafür wurde das Gewebe in 0,5 ml oder 1 ml Trizol aufgenommen und in einem 2 ml Eppie mit einer Stahlkugel im Homogenisator 30 sec bei 30 rpm homogenisiert. Je 1 ml Trizol wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, gevortext und 2 min inkubiert. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 14.000 rpm über 15 min bei 4 °C. Die obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde abgenommen und in ein neues 2 ml Eppie überführt. Je 1 ml Trizol wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben. Nach 20-maligem Invertieren und 10 min Inkubation erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 0,5 ml 75 %-igen Ethanol je 1 ml Trizol resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt über 5 min, bei 7500 rpm und 4 °C wurde das Pellet trocknen gelassen. Anschließend wurde die getrocknete RNA in RNase freiem Wasser aufgenommen und für 10 min bei 55 °C erhitzt. Die RNA Konzentration wurde mit Hilfe eines Photometers gemessen und die RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.7.2 Reverse-Transkriptase-Reaktion - cDNA

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion dient dazu, die RNA in cDNA umzuschreiben, um diese dann mit weiteren Methoden zu untersuchen. Nach der RNA-Isolation, wurde diese in cDNA umgeschrieben, um für weitere Analysen genutzt werden zu können. Dazu wurde zunächst die Menge der RNA-Lösung in µg/µl bestimmt, um 2 µg cDNA weiter zu verarbeiten. Anschließend wurden Wasser (ad 15 µl), Random-Primer (0,375 µl), Oligo-dT (1,5 µl) und dNTP (1,5 µl) hinzugegeben und das Gemisch wurde im Cyclor für 5 min bei 65 °C erhitzt. Danach wurde ein Mix aus 5XFirst-Strand-Buffer (6 µl), 0,1M DTT (3 µl), RNase-Out (1,5 µl) und Reverse-Transkriptase (1,5 µl) hinzugegeben. Das Gemisch wurde im Cyclor für 10 min auf 25 °C, dann für 50 min auf 37 °C und schließlich für

15 min auf 70 °C erhitzt. Die cDNA wurde für weitere Analysen bei -20 °C im Tiefkühler gelagert.

3.7.3 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real Time PCR ist eine Polymerase-Kettenreaktion, die zur Vervielfältigung von DNA dient und gleichzeitig eine Quantifizierung der DNA ermöglicht. Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen, die während der PCR-Reaktion erfasst werden, kann die Menge der PCR-Produkte bestimmt werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Produktmenge zu. Die Quantifizierung erfolgt anhand der Signale in der exponentiellen Phase der PCR. Als Farbstoff wurde SYBR Green verwendet, welches ein Cyanin-Farbstoff ist, der in doppelsträngige DNA interkaliert und somit als Nachweis genutzt wird. Dieser Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert grünes Licht bei 521 nm.

Für die Messung in der qRT-PCR wurde eine 384-Well-Platte genutzt. Je Ansatz wurde ein Mix mit 10 µl hergestellt. Je Mix wurden 5 µl SYBR, 0,3 µl je Primer (forward/reverse), 3,4 µl Wasser und 1 µl cDNA verwendet. Nachdem die Platte abzentrifugiert wurde, wurde sie im Cyclyer gemessen. Zusätzlich zu den ausgewählten Genen, wurde auf jeder Platte 5S als Housekeeping-Gen mitlaufen lassen, um die Daten anschließend zu normalisieren.

3.8 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mittels GraphPad Prism 5.0 durchgeführt. Da bei den Daten eine Normalverteilung angenommen wurde und jeweils nur zwei Gruppen verglichen wurden, wurde zur Analyse der ungepaarte T-Test mit einem Signifikanzniveau kleiner 0,05 gewählt. Um die Werte der einzelnen Tiere darzustellen, wurden diese mittels Punktelwolke gezeigt. Das überlagerte Balkendiagramm zeigt den Mittelwert der Werte.

4. Ergebnisse

4.1. Organschaden während der akuten Pankreatitis

Während der akuten Pankreatitis kommt es in 20 % der Fälle zu einem schweren Verlauf, welcher mit systemischen Komplikationen, wie z.B. akutem Organversagen assoziiert ist. Dabei kann es unter anderem zu respiratorischen oder renalen Komplikationen kommen. 15-55 % der Patienten entwickeln ein *akutes respiratorisches distress Syndrom* (ARDS). Neben dem akuten Lungenversagen, kommt es bei einem Großteil der Patienten zu einem akuten Nierenversagen (AKI – *acute kidney injury*). Die AKI tritt bei bis zu 70 % der Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis auf und erhöht das Mortalitätsrisiko signifikant. Um den Organschaden während der akuten Pankreatitis im Mausmodell zu untersuchen wurden die folgenden Analysen durchgeführt und ausgewertet.

4.1.1 Lungenschaden in der akuten Pankreatitis

Um den Lungenschaden zu untersuchen wurden Lungen H&E gefärbt und mittels Quant-Center-Software von Sysmex analysiert. Dabei wurden Alveolarraum und Gewebe ausgemessen und aufgetragen.

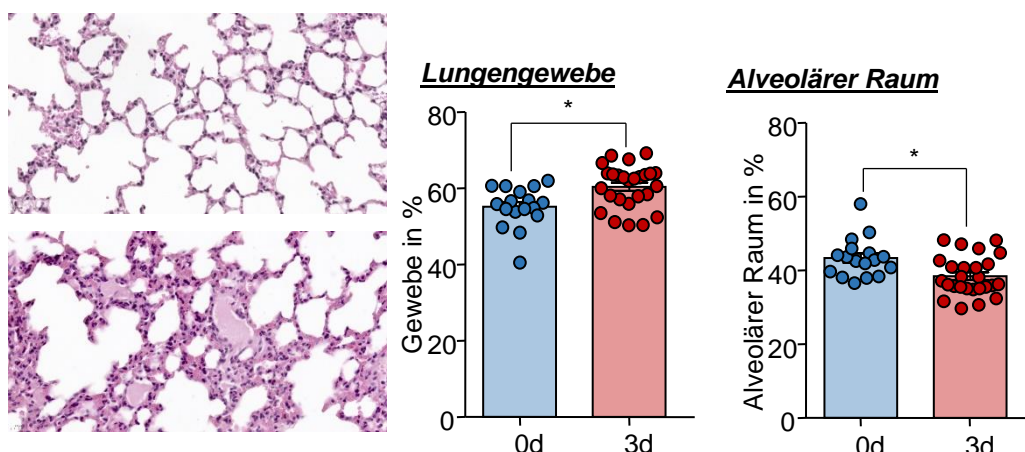


Abb.9: Um den Lungenschaden während der akuten Pankreatitis zu untersuchen, wurden Lungen H&E gefärbt, im SlideScanner gescannt und mit der Quant-Center-Software von Sysmex ausgemessen. Es wurden Lungengewebe und alveolärer Zwischenraum ausgemessen und bei GraphPad dargestellt. Links ist die H&E Färbung der Lunge zu sehen, mittig ist in blau der prozentuale Anteil des Lungengewebes in Kontrolltieren (n=17) und in rot das der Tiere an Tag 3 nach Pankreatitis (n=24) zu sehen. Rechts sind die Werte des prozentualen Zwischenraums aufgetragen (Kontrollgruppe n=17; Pankreatitis n=26).

4. Ergebnisse

Es war zu beobachten, dass die Tiere an Tag 3 nach Induktion der Pankreatitis (rot) signifikant mehr zelluläres Gewebe bzw. Infiltrat aufzeigten als gesunde Kontrolltiere (blau). Als Gegenkontrolle wurde der alveoläre Zwischenraum ausgemessen und auch hier war zu beobachten, dass nach Induktion der Pankreatitis (rot) signifikant weniger Freiraum zu messen war als in den gesunden Kontrolltieren (blau). Dies ist ein Zeichen für ein vermindertes Lungenvolumen sowie eine erhöhte Infiltration von Immunzellen.

4.1.2 Nierenschaden in der akuten Pankreatitis

Um den Nierenschaden im Mausmodell zu untersuchen, wurden Nieren entnommen und histologisch aufgearbeitet. Des Weiteren wurden NGAL als Schadensmarker mittels qrt-PCR analysiert und Kreatinin im Serum gemessen.

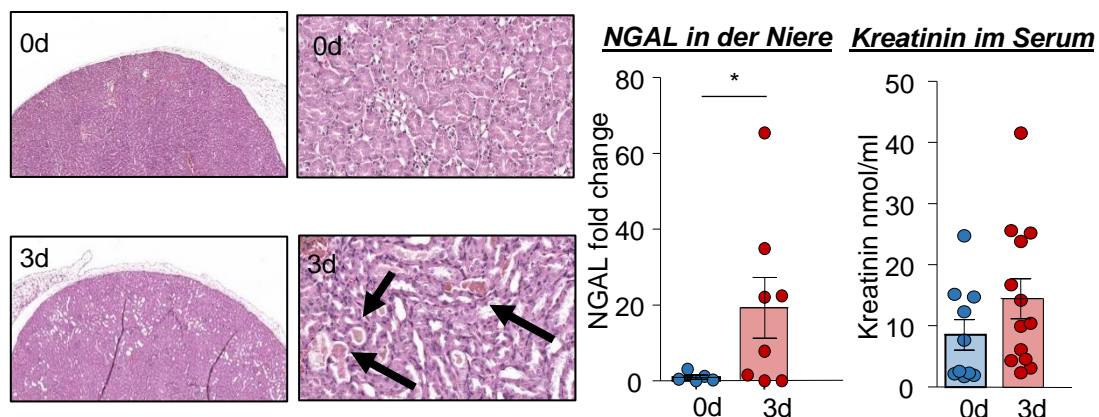


Abb10: Um den Schaden in der Niere zu untersuchen, wurden die Nieren H&E gefärbt und die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und es wurde NGAL (Kontrollgruppe n=5; Pankreatitis n=8) in der qrt-PCR analysiert. Ebenso wurde Kreatinin im Serum gemessen (Kontrollgruppe n=10; Pankreatitis n=13). Die Daten wurden mit GraphPad dargestellt.

Die H&E Färbung zeigt, dass sich die Nierenstruktur in den Tieren mit Pankreatitis im Vergleich zu der Kontrollgruppe deutlich verändert. Die Struktur sieht aufgelockert aus und Leukozyten infiltrieren die Glomeruli (Pfeile – zylinderförmige Formation). In der qrt-PCR-Analyse von NGAL ist zu sehen, dass NGAL, als Schadensmarker in der Niere, an Tag 3 nach Induktion der Pankreatitis signifikant ansteigt im Vergleich zu den Kontrolltieren an Tag 0. In den Kreatininwerten ist zu sehen, dass dieses an Tag 3 nach Pankreatitis ebenfalls ansteigt.

4.2. Makrophagen während der akuten Pankreatitis in der Lunge

Da histologisch ein deutliches Infiltrat von Leukozyten in der Lunge zu beobachten war, wurden Leukozyten aus dem Lungengewebe isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. CD62L (L-Selektin) ist ein Aktivierungsmarker auf Leukozyten, der während der Aktivierung der Zellen abgespalten wird, so dass aktivierte Zellen CD62L negativ sind. CD206 und CD163 sind klassische M2-Makrophagen Marker.

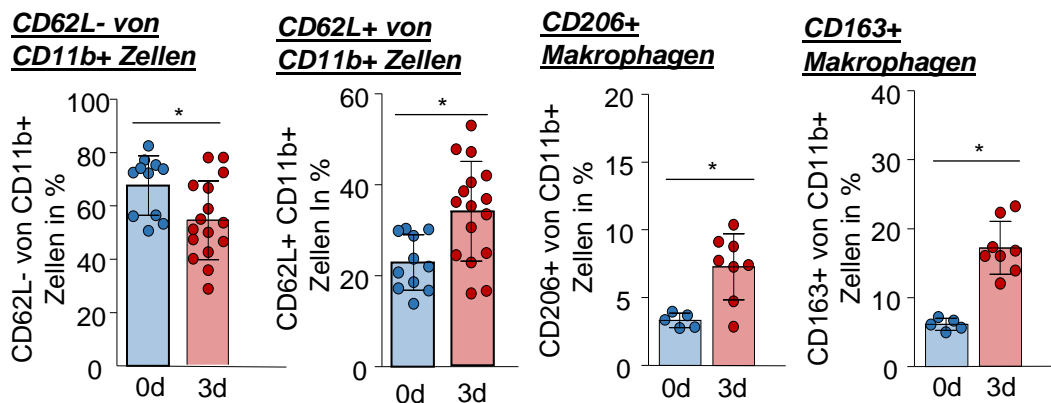


Abb.11: Leukozyten wurden aus der Lunge isoliert, gefärbt und im FACS gemessen. Die analysierten Daten wurden in Graph Pad dargestellt. Als Aktivierungsmarker wurde CD62L gefärbt (Kontrollgruppe n=11; Pankreatitis n=16). Aktivierte Zellen gelten als CD62L-. Zusätzlich wurden als M2-Makrophagenmarker CD206 und CD163 gefärbt und gemessen (Kontrollgruppe n=5; Pankreatitis n=8).

Es war zu beobachten, dass in den Lungen der Tiere an Tag 3 (rot) der akuten Pankreatitis signifikant mehr CD62L+ CD11b+ Zellen zu messen waren als in den Kontrolltieren (blau). Dies deutet auf eine erhöhte Zahl unreifer Makrophagen, also Monozyten, in der Lunge hin. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nach Induktion der Pankreatitis signifikant mehr CD206+ und CD163+ Makrophagen in der Lunge zu messen waren.

4.2.1 Real-Time-Deformability-Cytometry (RT-DC) von Monozyten

Um die physikalischen Eigenschaften der Monozyten zu untersuchen, wurden diese aus der Lunge isoliert und mittels Real-Time-Deformability-Cytometry (RT-DC) charakterisiert. Die RT-DC ist eine Messmethode, mit der Größe und Verformbarkeit von Zellen gemessen werden können. Dabei werden die Zellen vereinzelt an einer Kamera vorbei geschleust und es werden Aufnahmen gemacht, die anschließend ausgewertet werden können.

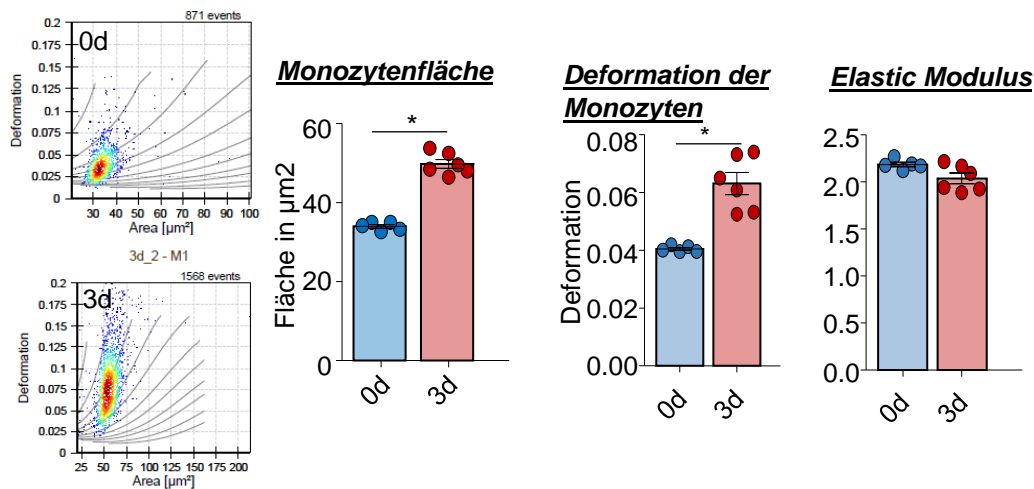


Abb.12: Monozyten wurden aus der Lunge isoliert und mittels RT-DC (Real-Time-Deformability-Cytometry) gemessen und analysiert. In Blau sind Monozyten aus gesunden Tieren aufgezeigt (n=5) und in Rot aus Tieren drei Tage nach Induktion der akuten Pankreatitis mittels Gangligatur (n=6). Die Größe, Deformation und das Elastikmodul wurden gemessen, analysiert und mit GraphPad dargestellt.

Es war zu beobachten, dass die Monozyten in den Tieren an Tag 3 (rot) signifikant größer waren als in den Kontrolltieren an Tag 0 (blau). Zusätzlich ist die Deformation nach drei Tagen signifikant erhöht. Das Elastic Modulus ist jedoch an Tag 3 leicht geringer als an Tag 0. Dies bedeutet, dass es sich um eine erhöhte Verformbarkeit handelt.

4.2.2 CD11b-Färbung als Nachweis für den Organschaden durch Monozyten

Die RT-DC-Analyse zeigte eine Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Monozyten und eine Zunahme ihres Volumens. Histologische Untersuchungen sollten nun aufzeigen, inwieweit auch die Anzahl der Monozyten im Gewebe zunahm. Dafür wurden Lunge und Niere entnommen, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Als Marker wurde sowohl in der Lunge als auch in der Niere CD11b immunohistochemisch gefärbt und quantifiziert.

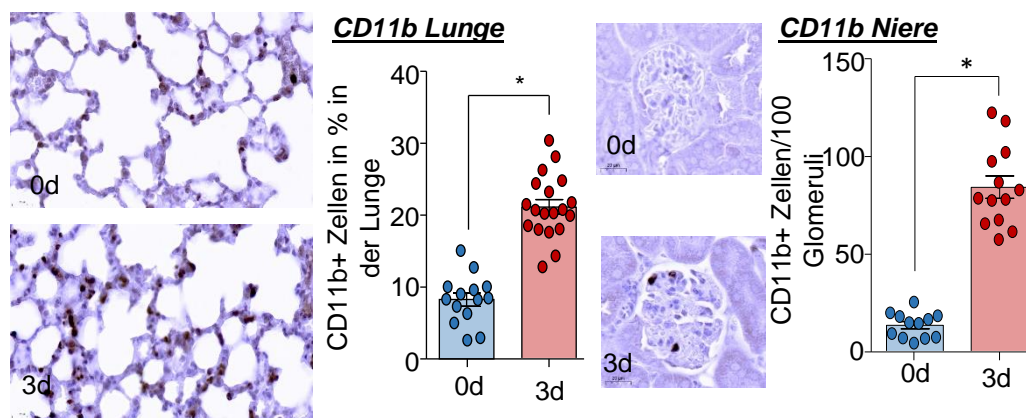


Abb.13: Lungen und Nieren wurden entnommen, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mittels IHC gefärbt. Es wurden CD11b+ Zellen gefärbt, analysiert und in GraphPad dargestellt. Die H&E Färbungen sind als 20-fache Vergrößerung dargestellt. In den Graphen ist in Blau die Kontrollgruppe an Tag 0 (n=14/12) und in Rot die Gruppe drei Tage nach Gangligatur (n=19/13) dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in der Lunge als auch in der Niere an Tag 3 nach Induktion der akuten Pankreatitis vermehrt CD11b+ Zellen zu beobachten waren. In der Lunge waren sowohl an Tag 0 als auch an Tag 3 CD11b+ Zellen anzufärben. Jedoch waren an Tag 3 signifikant mehr CD11b+ nachzuweisen. In der Niere waren in den Kontrolltieren an Tag 0 vereinzelte CD11b+ Zellen zu finden. An Tag 3 nach Induktion der akuten Pankreatitis waren jedoch auf 100 Glomeruli signifikant mehr CD11b+ Zellen zu detektieren als an Tag 0.

4.3. Neutrophilen- und Monozyten-Depletion in der akuten Pankreatitis

Es ist bekannt, dass Neutrophile und Makrophagen während der akuten Pankreatitis in Pankreas und Lunge einwandern. Diese beiden Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems werden für den lokalen Schaden verantwortlich gemacht. Welche Rolle sie für den systemischen Schaden spielen ist jedoch weitestgehend ungeklärt. Um zu überprüfen, welche Zellen für den systemischen Schaden bzw. Organschaden im Verlauf der schweren akuten Pankreatitis verantwortlich sind, wurden einerseits Neutrophile mit Hilfe eines Anti-Ly6G-Antikörpers und andererseits Monozyten mit Hilfe eines anti-CCR2-Antikörpers depletiert. Zusätzlich wurde eine Gruppe mit dem Isotypen IgG2a oder IgG2b des Antikörpers behandelt

4.3.1 Überprüfung der Neutrophilen- und Monozyten-Depletion

Um den Erfolg der Depletion der Neutrophilen (mittels anti-Ly6G-Antikörpers) und der Monozyten (mittels anti-CCR2-Antikörpers) zu überprüfen, wurden die Leukozyten der Lunge und der Milz mittels Durchflusszytometrie untersucht. Sowohl in der Lunge als auch in der Milz wurde als Kontrolle der Ly6G-Depletion, und somit die Neutrophilen-Depletion, Ly6G gefärbt und überprüft.

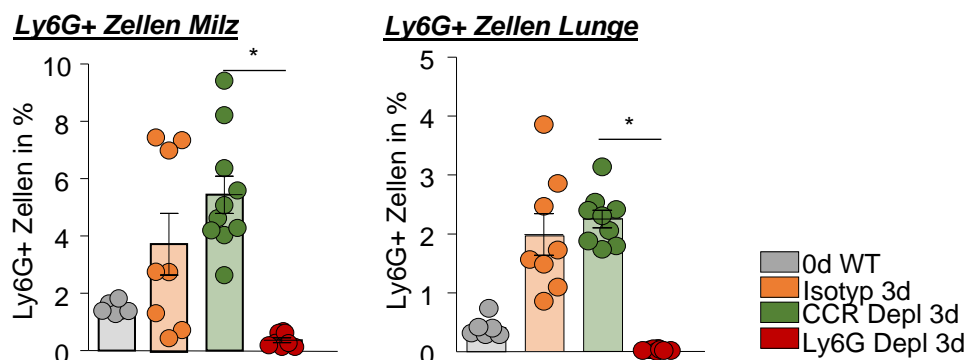


Abb.14: Um die Neutrophilen-Depletion zu überprüfen wurden Leukozyten aus der Lunge und der Milz isoliert, mit Antikörpern gefärbt, im FACS gemessen, mit FlowJo ausgewertet und in GraphPad dargestellt. Als Marker wurde Ly6G gefärbt. In Grau sind die Werte der Kontrollgruppe an Tag 0 (n=6) aufgezeigt, in Orange die Werte der Gruppe, die mit dem Isotypen behandelt wurde (n=8), in Grün die anti-CCR2 behandelte (n=10) und in Rot die anti-Ly6G behandelte Gruppe (n=6).

4. Ergebnisse

Es ist zu sehen, dass die Gruppe, die mit dem anti-Ly6G-Antikörper (rot) behandelt wurde, sowohl in der Milz als auch in der Lunge eine signifikante Reduktion der Ly6G+ Zellen zeigt. Im Vergleich zu den Kontrolltieren (grau) steigen die Ly6G+ Zellen sowohl in der Isotyp- (orange) als auch anti-CCR2-Antikörper behandelten (grün) Gruppe signifikant an. Die anti-CCR2-Antikörper behandelten Tiere zeigen signifikant erhöhte Werte verglichen mit den Isotyp-Antikörper behandelten Tieren (grün vs. orange).

Um zu überprüfen, ob der anti-CCR2-Antikörper, und somit die Monozyten-Depletion funktioniert hat, wurden CD11b+Ly6C+ Zellen (Monozyten) gefärbt und ausgewertet.

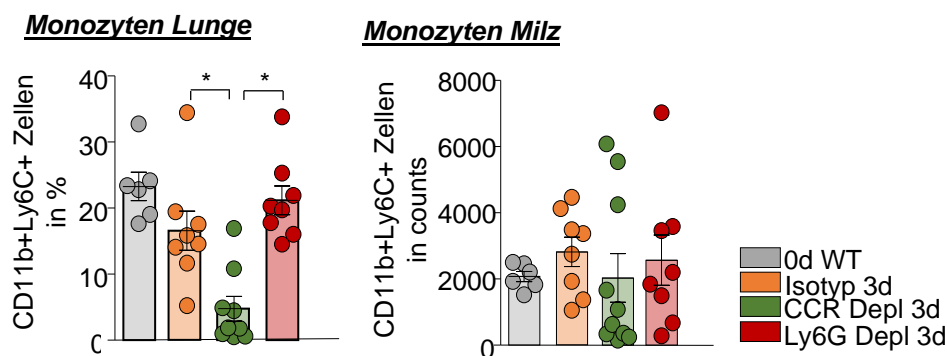


Abb.15: Um die Monozyten-Depletion zu überprüfen wurden Leukozyten aus der Lunge und der Milz isoliert, mit Antikörpern gefärbt, im FACS gemessen, mit FlowJo ausgewertet und in GraphPad dargestellt. Als Marker wurden CD11b und Ly6C gefärbt. In Grau sind die Werte der Kontrollgruppe an Tag 0 aufgezeigt (n=6), in Orange die Werte der Gruppe, die mit dem Isotyp Antikörper behandelt wurde (n=8), in Grün die anti-CCR2-Antikörper behandelte (n=10) und in Rot die anti-Ly6G-Antikörper behandelte Gruppe (n=8).

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die mit dem anti-CCR2-Antikörper behandelten Tiere sowohl in der Lunge als auch in der Milz deutlich weniger CD11b+Ly6C+ Zellen aufzeigten (grün). Die Kontrollgruppe (grau), die mit dem Isotyp-Antikörper behandelten wurden (orange) und die Gruppe der anti-Ly6G-Antikörper behandelten (rot) Tiere zeigen ähnliche Werte auf.

4.3.2 Schweregradmarker der akuten Pankreatitis nach Neutrophilen- und Monozyten-Depletion

Um den Schweregrad der akuten Pankreatitis zu überprüfen, wurden die Aktivität von Amylase und Lipase im Serum der Tiere und die MPO in der Lunge gemessen. Amylase und Lipase werden während der akuten Phase der Pankreatitis ins Serum freigesetzt und spiegeln den Gewebeschaden des Pankreas wieder. Die MPO Messung in der Lunge ist ein Marker für eingewanderte Neutrophile oder Monozyten.

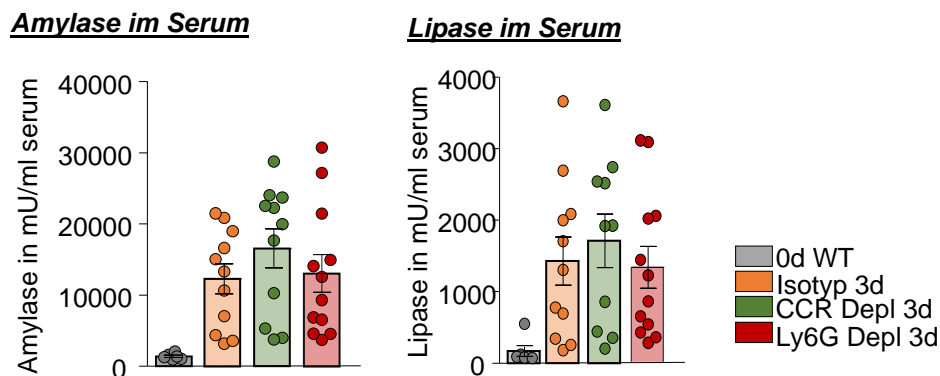


Abb.16: Als Schweregradmarker für die akute Pankreatitis, also für den Gewebeschaden im Pankreas, wurden Amylase und Lipase im Serum gemessen. Die Daten wurden in GraphPad dargestellt. In Grau sind die Werte der Kontrollgruppe an Tag 0 aufgezeigt (n=6), in Orange die Werte der Gruppe, die mit dem Isotyp Antikörper behandelt wurde (n=11), in Grün die anti-CCR2-Antikörper behandelte (n=11) und in Rot die anti-Ly6G-Antikörper behandelte Gruppe (n=12).

Drei Tage nach Induktion der Pankreatitis stieg die Aktivität von Amylase und Lipase in allen experimentellen Gruppen signifikant an (orange, grün, rot). Mittels H&E Färbung wurde der Schaden im Pankreas visualisiert.

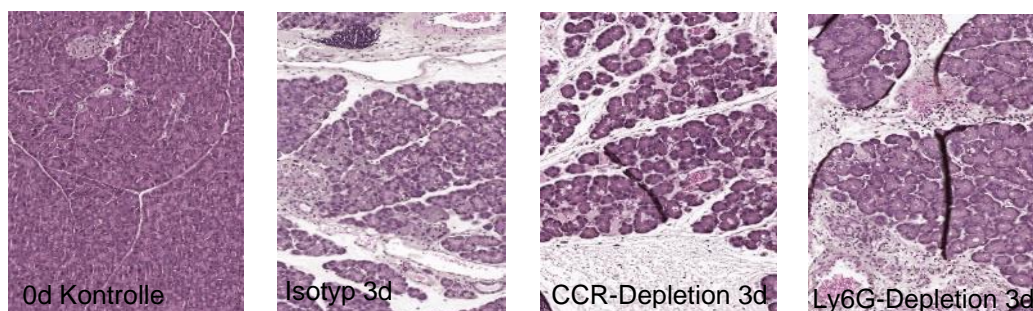


Abb.17: Um den Schaden der akuten Pankreatitis zu visualisieren, wurde das Pankreas nach der Entnahme in Paraffin eingebettet und Schnitte wurden angefertigt. Diese wurden H&E gefärbt und es wurden Bilder im Slidescanner gemacht. Die Bilder wurden 20-fach vergrößert.

4.3.3 Lungenschaden und Funktion in der Neutrophilen- und Monozyten-Depletion

Um die Lungenfunktion während der akuten Pankreatitis zu messen, wurde den Mäusen an Tag 3 nach Induktion der akuten Pankreatitis arterielles Blut aus der *Carotis communis* entnommen, um eine Blutgasanalyse durchzuführen. Zusätzlich wurden die Lungen entnommen und die MPO wurde als Schadensmarker in der Lunge gemessen. Die Werte der Mäuse an Tag 3 wurden mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

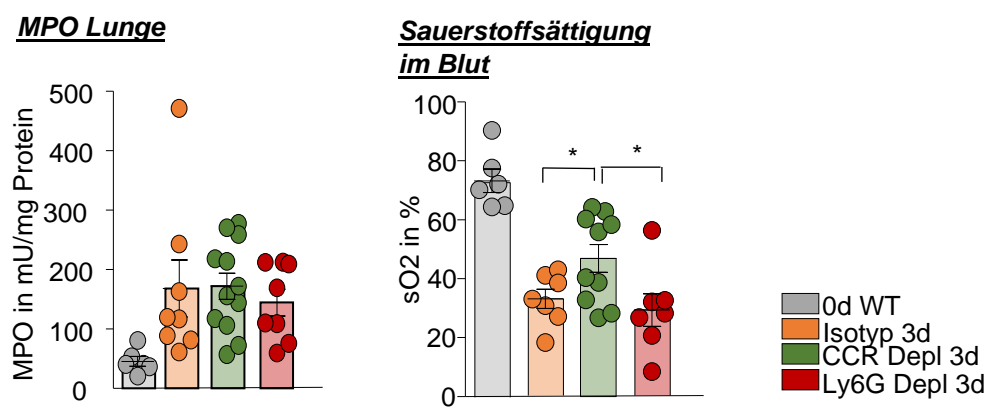


Abb.18: Um die Lungenfunktion zu überprüfen, wurden verschiedene Marker gemessen. Die MPO wurde im Lungengewebe und die Sauerstoffsättigung im Blut der Mäuse an Tag 0 und 3 nach akuter Pankreatitis gemessen. In Grau ist die Kontrollgruppe an Tag 0 zu sehen (n=6), in Orange die Isotyp-Antikörper behandelte Gruppe (n=8/7), in Grün die anti-CCR2-Antikörper (n=12/10) und in Rot die anti-Ly6G-Antikörper behandelte Gruppe (n=8/7).

Die Sauerstoffsättigung der Blutgasanalyse zeigte, dass diese während der akuten Pankreatitis verglichen mit der Kontrollgruppe an Tag 0 abnimmt. Vergleicht man die einzelnen Gruppen untereinander, so war zu beobachten, dass die Gruppen, die mit dem Isotyp-Antikörper und anti-Ly6G-Antikörper behandelt wurden ähnliche Werte aufzeigen (orange und rot). Die Gruppe, die mit dem anti-CCR2-Antikörper behandelt wurde, zeigte eine signifikant höhere Sauerstoffsättigung (grün). Die MPO-Messung zeigte, dass die Werte in den Gruppen an Tag 3 der akuten Pankreatitis signifikant anstiegen verglichen mit der Kontrollgruppe an Tag 0. Jedoch zeigte sich zwischen den Gruppen an Tag 3 kein Unterschied.

4.3.4 Nierenschaden in der Neutrophilen- und Monozyten-Depletion

Um den Nierenschaden während der Neutrophilen- und Monozyten-Depletion zu überprüfen, wurden qrt-PCR-Analysen von Nieren durchgeführt und NGAL wurde als Schadensmarker für einen Nierenschaden analysiert. Die Genexpression von NGAL wurde auf das Housekeeping-Gen 5S normalisiert. Zusätzlich wurde ein Kreatinin-ELISA mit den Serumproben durchgeführt. Ein erhöhtes Kreatinin im Serum spricht für eine Nierenschädigung.

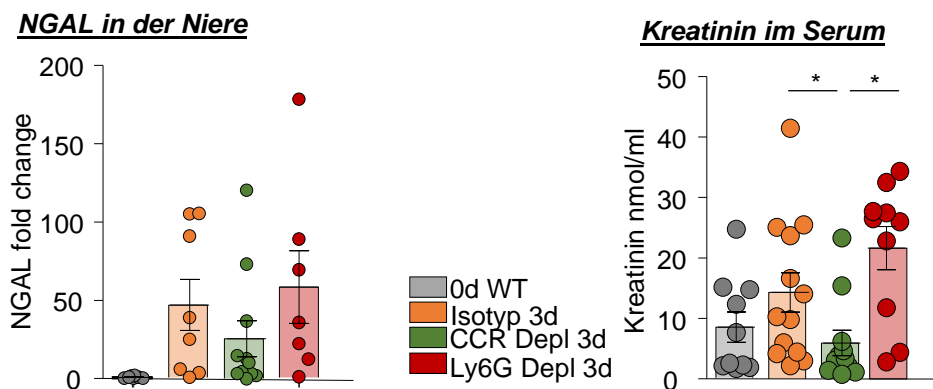


Abb.19: Um den Nierenschaden in der akuten Pankreatitis zu analysieren, wurden Nieren nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und RNA wurde isoliert. Anschließend wurde diese in cDNA umgeschrieben und es wurde die Genexpression von NGAL als Schadensmarker mittels qrt-PCR analysiert. Zusätzlich wurden die Kreatininwerte im Serum mittels ELISA bestimmt. In Grau ist die Kontrollgruppe an Tag 0 dargestellt (n=6/10), in Orange die Gruppe, die neben der Induktion der Pankreatitis den Isotyp-Antikörper erhalten hat (n=8/13). Die Gruppe in Grün und Rot haben neben der akuten Pankreatitis den anti-CCR2-Antikörper (n=10) oder den anti-Ly6G-Antikörper erhalten (n=7/10).

Es war zu beobachten, dass in den Kontrolltieren (grau) eine sehr geringe Basisexpression von NGAL vorhanden war. An Tag 3 nach Induktion der akuten Pankreatitis via Gangligatur war ein signifikanter Anstieg zu detektieren (orange, grün, rot). Vergleicht man die Gruppen an Tag 3, konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der Monozyten-Depletion mittels anti-CCR2-Antikörper (grün) die geringste NGAL-Expression aufzeigt. Die Gruppe, die den Isotyp-Antikörper (orange) oder den anti-Ly6G-Antikörper (rot) erhalten haben, zeigten einen etwas höheren Wert. Den gleichen Trend sehen wir in den Kreatininwerten im Serum. Jedoch sind die Werte in der Ly6G-Depletion und in der Gruppe des Isotyp-Antikörpers signifikant höher als die Werte während der Monozyten-Depletion (CCR2-Depletion).

4.4. Expression von IL33

Interleukin 33 (IL33) ist ein Zytokin der IL1-Familie, das unter anderem Einfluss auf Makrophagen und Monozyten hat. Um zu untersuchen, welche Rolle IL33 während der akuten Pankreatitis spielt und welchen Einfluss es auf den Organschaden hat, wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

4.4.1 Hochregulation von IL33 in Makrophagen

Makrophagen wurden aus dem Knochenmark (*bone marrow derived macrophages* – BMDM) von Wildtypen isoliert und für 7 Tage mit M-CSF in Zellkultur in 10 cm Schalen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden diese für 6 Stunden mit LPS oder CCK-stimulierten und somit nekrotischen Azinuszellen co-inkubiert.

4.4.2 Transkriptomanalysen von Makrophagen

Transkriptomanalysen von aus dem Knochenmark isolierten Makrophagen wurden durchgeführt, um zu untersuchen, welche Zytokine während der akuten Pankreatitis ausgeschüttet werden. Einerseits wurden die Makrophagen mit LPS stimuliert, um den klassischen M1-Phänotyp zu induzieren, andererseits wurden sie mit CCK-stimulierten Azinuszellen co-inkubiert, um so die Bedingungen während der Pankreatitis *in vitro* nachzustellen. In der Abbildung sind in der Tabelle durch eine rote Färbung die Zytokine dargestellt, die hochreguliert wurden. Die ersten drei Spalten gehören dabei zu den Makrophagen, die mit LPS stimuliert wurden und die nächsten drei Spalten zeigen die Zytokine der Makrophagen, die CCK-stimulierten Azini ausgesetzt waren. Das rechts angefügte Balkendiagramm zeigt an, in welchem Maße die Zytokine hochreguliert wurden. Dabei gibt Blau die Azini-behandelten Makrophagen an und Rot die LPS behandelten Makrophagen. In der Vergrößerung ist das Zytokin aufgezeigt, das in der

4. Ergebnisse

Azini-behandelten Gruppe hochreguliert war, jedoch nicht in der LPS-behandelten Gruppe.

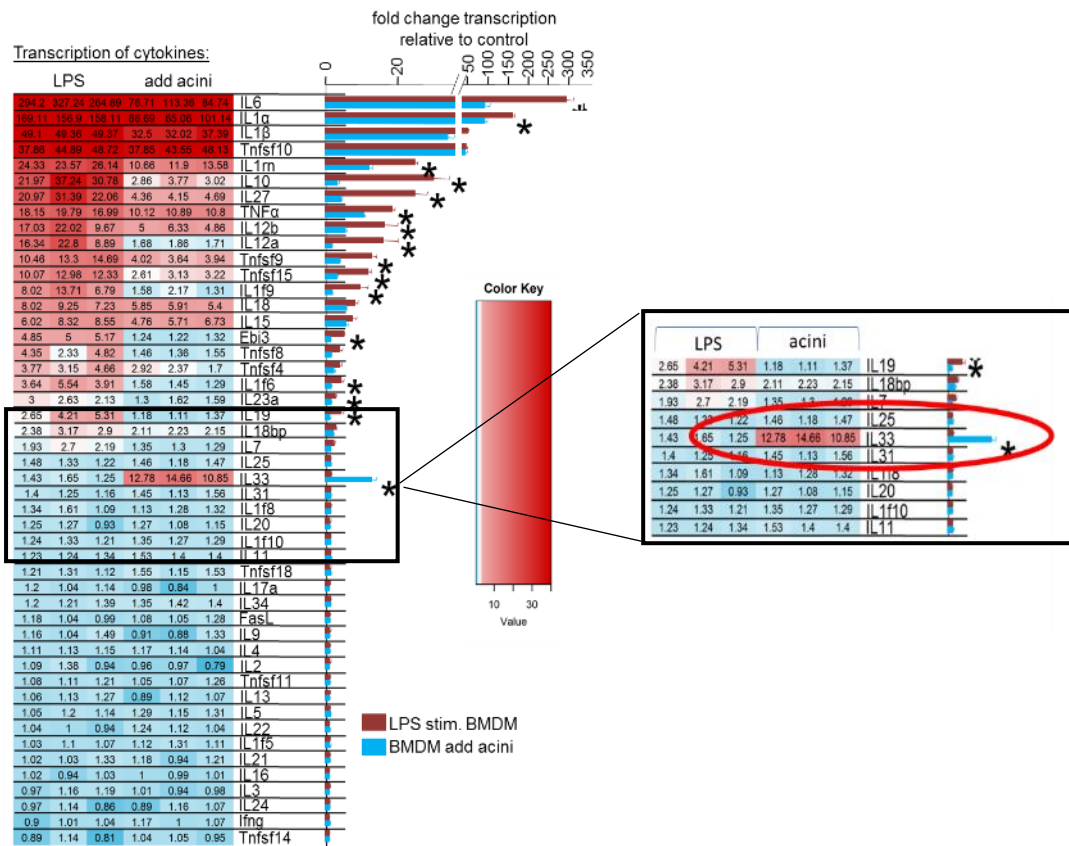


Abb.20: In der Abbildung sind die Ergebnisse der Transkriptomanalysen der Makrophagen zu sehen. Es wurden Analysen von Makrophagen gemacht, die eine Woche unter M-CSF ausdifferenziert und anschließend für 6 Stunden mit LPS oder CCK-stimulierten Azinuszellen inkubiert wurden. Sind Zytokine in der Tabelle rot gefärbt bedeutet dies, dass diese hochreguliert sind. Das Balkendiagramm, das rechts angehängt ist zeigt in Blau die Zytokine der Makrophagen, die mit Azinuszellen behandelt wurden und in Rot die Zytokine der LPS stimulierten Makrophagen an. Die Vergrößerung zeigt das Zytokin an, das in Azinus behandelten Makrophagen hochreguliert war, jedoch nicht in LPS behandelten.

Es konnte beobachtet werden, dass die Behandlung mit LPS zu einer Hochregulation von klassischen M1-Makrophagen Zytokinen führte. Dazu gehören z.B. IL6, IL1 α und IL1 β . Diese Zytokine waren ebenfalls in den mit CCK-stimulierten Azini co-inkubierten Makrophagen hochreguliert. Zytokine, wie z.B. IL10, TNF α und IL12 α waren in LPS behandelten Makrophagen signifikant höher induziert als in mit Azini behandelten Makrophagen. Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass es sich in der Pankreatitis nicht um eine klassische Typ1-Immunantwort handelt, sondern es zu einer alternativen Makrophagenreaktion kommt. Insgesamt sind in LPS behandelten Makrophagen mehr Zytokine hochreguliert als in Azini-behandelten Makrophagen. Jedoch gibt es ein Zytokin, das nur in Azini-

behandelten Makrophagen hochreguliert ist. Das Interleukin 33 scheint eine Pankreatitis spezifische Reaktion zu sein.

4.4.3 ELISA-Messung des Mediums der Makrophagen

Ein weiterer Nachweis für die Expression von IL33 durch Azini-behandelte Makrophagen wurde durch einen ELISA erbracht. Dazu wurden erneut Makrophagen aus dem Knochenmark von Wildtypmäusen isoliert und für sieben Tage mit M-CSF bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden Azinuszellen isoliert und entweder mit CCK behandelt und zu den Makrophagen hinzugegeben oder allein ausgesät. Unbehandelte Makrophagen dienten als Kontrolle. Anschließend wurde das Medium abgenommen und für ELISA Messungen verwendet.

IL33 Sekretion

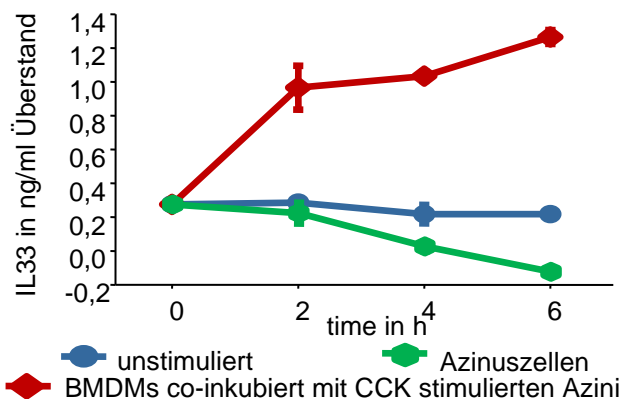


Abb. 21: Zu sehen ist die ELISA Messung der IL33 Expression von unstimulierten Makrophagen (blau), von Azini-behandelten Makrophagen (rot) und von Azinuszellen (grün). Auf der X-Achse sind die Zeitpunkte der Messung aufgetragen, auf der Y-Achse die Menge des IL33 in ng/ml Überstand.

Es war zu messen, dass unstimulierte Makrophagen (blaue Kurve) kein IL33 sezernierten. Azinuszellen allein (grüne Kurve) setzten ebenfalls kein IL33 frei. Makrophagen, die mit CCK-stimulierten Azinuszellen behandelt wurden, setzten jedoch schon nach kurzer Zeit IL33 ins Medium frei (rote Kurve).

4.4.4 X-Gal-Färbung zum Nachweis der IL33-Expression

Mit Hilfe einer IL33-Reporter-Maus sollte weiterhin untersucht werden, welche Zellen IL33 exprimieren. Sowohl Gewebe als auch Zellen wurden mittels eines X-Gal Kits gefärbt. Dabei wurden Proben von IL33-Reporter-knock-out-Mäusen verwendet. Diese haben die Besonderheit, dass sie durch die Insertion eines Vektors, statt IL33 β -Galactosidase exprimieren. Die Färbung durch das X-Gal Kit basiert auf der Zugabe von X-Gal auf das zu färbende Gewebe/ Zellen. Das Enzym β -Galactosidase hydrolysiert X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl (5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol). Das 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird vom Sauerstoff der Luft zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert.

4.4.4.1 X-Gal-Färbung von Makrophagen und Azinuszellen in Zellkultur

Azinuszellen und Makrophagen von heterozygoten IL33Gt/+ Mäusen wurden isoliert und anschließend mit dem X-Gal Kit von Merck gefärbt, um zu untersuchen, ob diese IL33 exprimieren. Die Azinuszellen wurden isoliert und in Chamber Slides für 30 min inkubiert, bis sich diese abgesenkt hatten. Anschließend wurden sie gefärbt. Die Makrophagen wurden erneut aus dem Knochenmark isoliert und 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ mit M-CSF inkubiert, bevor sie gefärbt wurden.

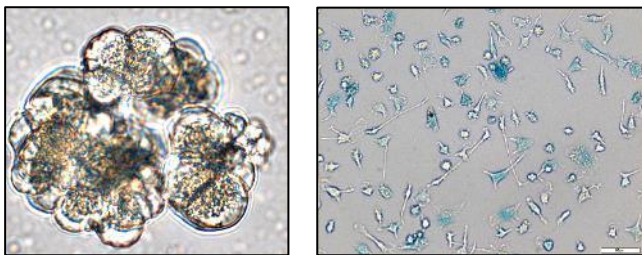


Abb.22: Azinuszellen (links) und Makrophagen (rechts) wurden in Zellkultur mit dem X-Gal Kit gefärbt. Azinuszellen zeigen keine Blaufärbung auf, Makrophagen sind deutlich blau gefärbt

Es war zu beobachten, dass Azinuszellen keine Blaufärbung zeigten (links). Makrophagen hingegen zeigten eine deutliche Blaufärbung (rechts). Das bedeutet, dass Azinuszellen kein IL33 exprimierten. Makrophagen hingegen exprimierten IL33.

4.4.4.2 X-Gal-Färbung von Geweben

Um *in vivo* zu überprüfen, welche Zellen IL33 exprimieren wurden Organe aus IL33^{-/-} Tieren nach der Organentnahme in TissueTec eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt und diese mit dem X-Gal Kit angefärbt. (siehe β Galactosidase Detektion Methoden 3)

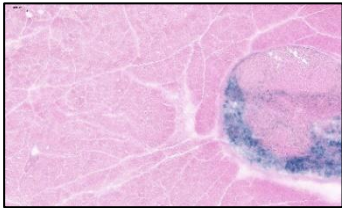


Abb.23: Pankreas IL33^{-/-}, 10µm, X-Gal Kit, 0d, 10-fach

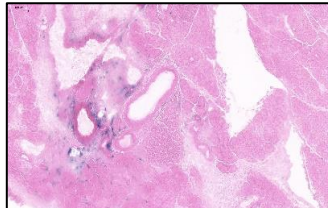


Abb.24: Pankreas IL33^{-/-}, 10µm, X-Gal Kit, 3d, 10-fach

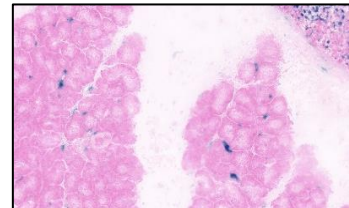


Abb.25: Pankreas IL33^{-/-}, 10µm, X-Gal Kit, 3d, 20-fach

Im Pankreas war deutlich zu beobachten, dass die Azinuszellen kein IL33 exprimieren. Nur im lymphatischen Gewebe konnte X-Gal nachgewiesen werden. An Tag 3 (siehe Abb. 24/25) waren IL33 exprimierende Zellen im Pankreasgewebe zu sehen. Die Azinuszellen waren jedoch weiterhin negativ. In der 20-fachen Vergrößerung ist zu sehen, dass es sich bei den IL33 exprimierenden Zellen um Makrophagen handelte, die zwischen den Azinuszellen lokalisiert waren. In der oberen Ecke ist ebenfalls ein positiver Lymphknoten zu sehen (siehe Abb. 25).

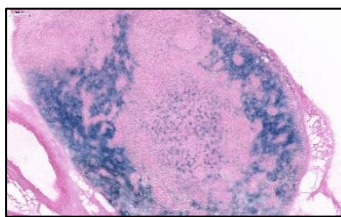


Abb.26: Lymphknoten IL33^{-/-}, 10µm, X-Gal Kit, 0d, 10-fach

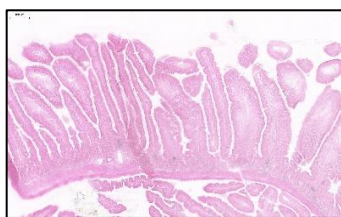


Abb.27: Darm IL33^{-/-}, 10µm, X-Gal Kit, 0d, 10-fach

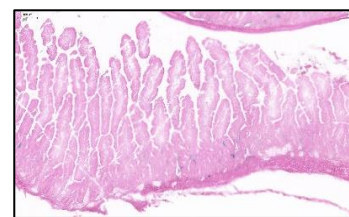


Abb.28: Darm IL33^{-/-}, 10µm, X-Gal Kit, 3d, 10-fach

Im Lymphknoten war zu sehen, dass nicht alle Bereiche blau gefärbt waren. Besonders im äußeren Bereich des Lymphknotens war somit eine IL33-Expression zu sehen (siehe Abb. 26). Im Darm konnten sowohl an Tag 0 als auch an Tag 3 nur wenige Zellen angefärbt werden. Es gab wenige blaue Zellen in der Mukosa (siehe Abb. 27/28). Diese Färbungen sprechen dafür, dass es Immunzellen sind, die IL33 exprimieren.

4. Ergebnisse

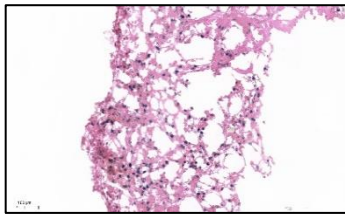


Abb.29: Lunge IL33^{-/-}, 10µm, X-Gal Kit, 0d, 10-fach

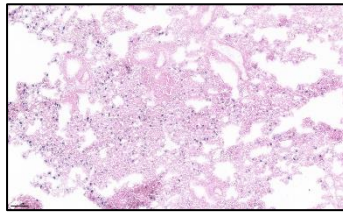


Abb.30: Lunge IL33^{-/-}, 10µm, X-Gal Kit, 3d, 10-fach

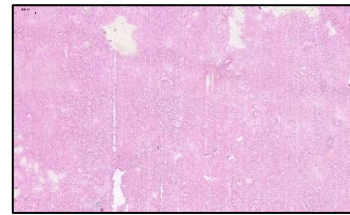
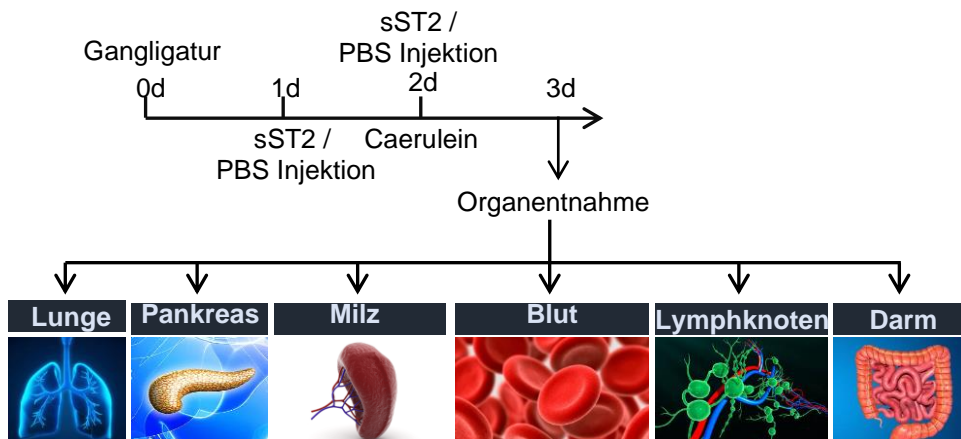


Abb.31: Niere IL33^{-/-}, 10µm, X-Gal Kit, 3d, 10-fach

In der Lunge waren sowohl bei 0 Tagen als auch bei 3 Tagen deutliche Färbungen erkennbar, die das ganze Gewebe durchziehen. In der gesamten Lunge gibt es IL33-exprimierende Zellen (siehe Abb. 29/30). In der Niere hingegen war keine Blaufärbung zu erkennen (siehe Abb. 31).

4.5. sST2-Modell – akute Pankreatitis mittels Gangligatur

Um zu untersuchen, welchen Einfluss IL33 in seiner Funktion als Alarmin im Verlauf der schweren akuten Pankreatitis hat, wurde den Tieren sST2 gespritzt, welches wie ein blockierender Antikörper wirkt und IL33 bindet, so dass es nicht an den zellulären membranständigen ST2 Rezeptor binden kann. sST2 wurde einen und zwei Tage nach der Gangligatur mit einer Menge von 50 µg i.p. injiziert. Als Kontrolle wurden Tiere mit PBS behandelt. An Tag 2 nach Gangligatur wurde ebenfalls Caerulein i.p. gespritzt und an Tag 3 wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und aufgearbeitet.



4.5.1 Schweregrad der akuten Pankreatitis im sST2-Modell

Um den Schweregrad der akuten Pankreatitis zu ermitteln, wurden Amylase und Lipase im Serum sowie die MPO in Lunge und Pankreas gemessen. Amylase und Lipase werden bei einem Pankreasgewebeschaden ins Blut freigesetzt und können somit indirekt Auskunft über das Ausmaß des Pankreasschadens geben. MPO wird als Schadensmarker der Lunge und des Pankreas, verursacht durch Neutrophile oder Monozyten, gemessen.

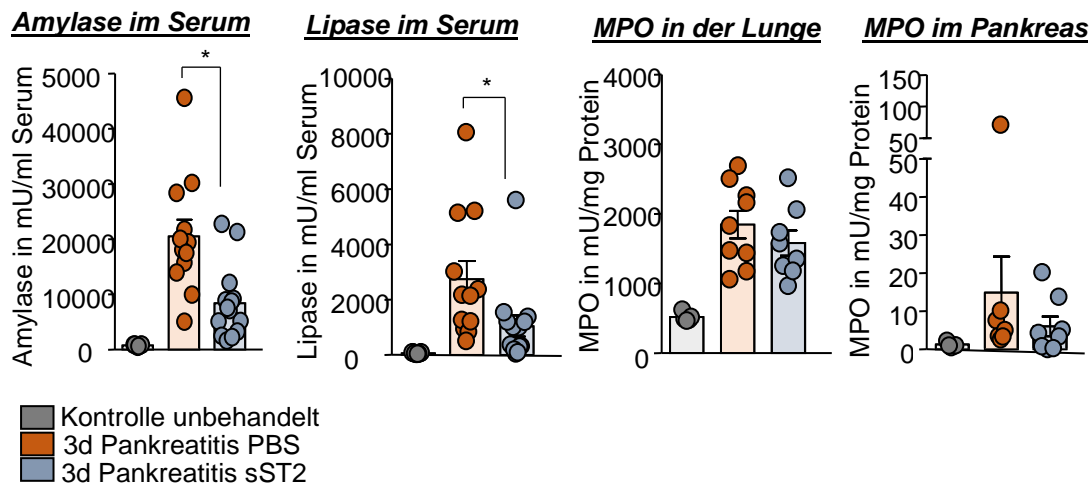


Abb.32: Schweregradbestimmung der induzierten akuten Pankreatitis nach 3 Tagen durch die Messung von Amylase und Lipase im Serum und durch die Bestimmung von MPO in Lunge und Pankreas. In Grau sind Tiere an Tag 0 (n=3) dargestellt, in Orange die Tiere an Tag 3 nach Gangligatur (n=12/9) und in Blau die Tiere an Tag 3 nach Gangligatur und sST2-Induktion (n=13/8).

Es war zu beobachten, dass die Schweregradmarker während der akuten Pankreatitis anstiegen (orange, blau) verglichen mit Tieren, die keine Pankreatitis aufwiesen (grau). Die Gruppe, die therapeutisch mit sST2 behandelt wurde (hier in blau), zeigte sowohl in der Amylase und Lipase als auch bei beiden MPO Messungen geringere Werte auf. Die MPO ist ein Marker für die Einwanderung von Neutrophilen oder Monozyten in die Lunge und gibt indirekt die Schwere des Lungenschadens während der Pankreatitis an.

4. Ergebnisse

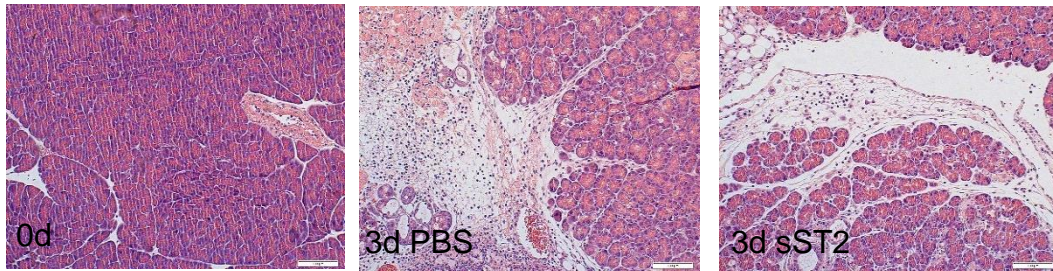


Abb.33: H&E Färbung des Pankreas an Tag 0 und 3 Tage nach Induktion der akuten Pankreatitis mittels Gangligatur und der Gabe von PBS oder sST2.

In der H&E Färbung, die dazu dient, die strukturellen Veränderungen im Pankreas aufzuzeigen, war zu beobachten, dass die Azinuszellen in den 0d Kontrolltieren dicht beieinander liegen und keine Lücken aufzeigen. Nach 3 Tagen ist ein Schaden zu sehen, und die Azinuszellen sind durch die Bildung von Ödemen teilweise auseinandergerissen. Es ist zu sehen, dass Immunzellen einwandern und sich nekrotische Areale bilden. Die Gruppe, die mit PBS behandelt wurde, zeigte eine größere Fläche des Schadens auf als die sST2-behandelten Tiere. Die Schnitte wurden eingescannt und mittels QC Software-Pattern von Sysmex wurde die Infiltration ausgewertet. Auch hier war zu beobachten, dass die Tiere, die mit sST2 behandelt wurden, einen deutlich geringeren pankreatischen Schaden zeigten als die mit PBS behandelten Tiere.

Schaden im Pankreas

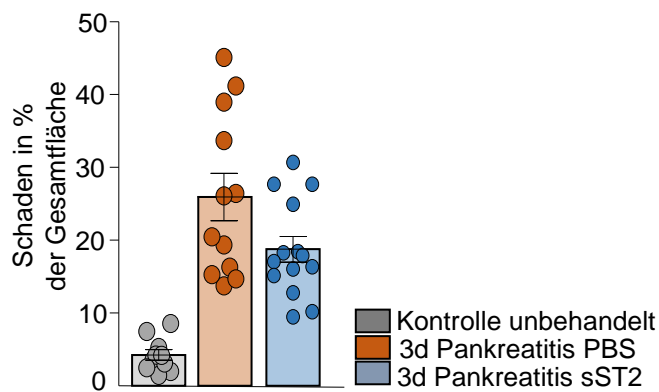


Abb.34: Auswertung der H&E Färbung des Pankreasgewebes. Es wurde der Schaden des gesamten Schnitts in % gemessen und aufgetragen. In Grau sind die Tiere ohne Pankreatitis zu sehen (n=9). In Orange ist die Gruppe dargestellt, die nach der Gangligatur mit PBS behandelt wurde (n=12) und in Blau die Gruppe, die sST2 induziert bekommen hat (n=14).

4.5.2 Das Immunsystem in der akuten Pankreatitis

Kommt es zu einem Schaden des Pankreasgewebes, induziert durch eine akute Pankreatitis, wird das Immunsystem aktiviert. Zunächst wird das angeborene, unspezifische Immunsystem aktiviert und Makrophagen und Neutrophile wandern als erste Reaktion in das geschädigte Gewebe ein. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung des adaptiven, spezifischen Immunsystems. Unter anderem werden T-Zellen aktiviert und steuern die Immunantwort über Zytokine.

4.5.2.1 Angeborenes Immunsystem im sST2-Modell

Neben Makrophagen und Neutrophilen zählen auch angeborene lymphoide Zellen (ILC) zu den Zellen des angeborenen Immunsystems. ILCs ähneln in den Grundzügen den T-Zellen und übernehmen regulatorische Funktionen während der Immunantwort. Um das angeborene Immunsystem zu untersuchen, wurden ebenfalls FACS Analysen gemacht. Dafür wurden die Splenozyten aus der Milz isoliert und mit Immunfluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt. Die Daten wurden mit FlowJo ausgewertet und in GraphPad dargestellt.

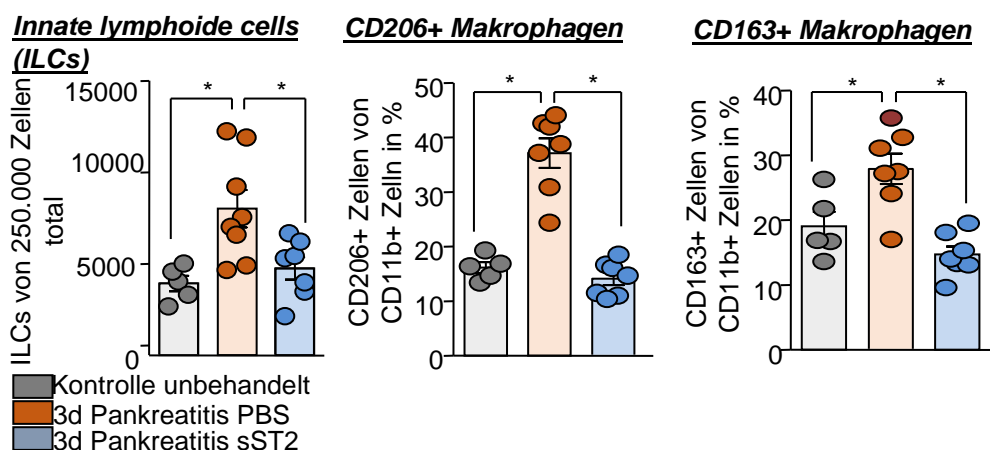


Abb.35: Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören u.a ILCs und Makrophagen. Für M2-Typ-Makrophagen gibt es unterschiedliche Marker, wie z.B CD206 und CD163. Zusätzlich sind Makrophagen CD11b+. ILCs sind definiert als lin-CD90+CD127+. In Grau sind Tiere an Tag 0 dargestellt (n=5), in Orange die Tiere an Tag 3, die eine Gangligatur hatten und PBS injiziert bekamen (n=8/7) und in Blau die Tiere an Tag 3, die eine Gangligatur hatten und zusätzlich sST2 induziert bekamen (n=7).

4. Ergebnisse

Es konnte gemessen werden, dass sowohl die ILCs als auch die CD206+ und CD163+ Makrophagen in der Pankreatitis signifikant ansteigen (grau vs. orange). In Tieren, die mit sST2 behandelt wurden (blau) war dieser Effekt nicht nachzuweisen. ILCs und Makrophagen waren im Vergleich zu den PBS behandelten Tieren signifikant reduziert.

4.5.2.2 Adaptives Immunsystem im sST2 Modell - T-Zell-Aktivierung während der akuten Pankreatitis

Während der akuten Pankreatitis kommt es zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Dabei werden T-Zellen aktiviert, die auf ihrer Oberfläche Aktivierungsmarker, wie z.B. CD25 und CD69 hochregulieren. Um diese Marker zu messen, wurden FACS Analysen von Splenozyten durchgeführt. Dafür wurden die Zellen aus der Milz isoliert und mittels Immunfluoreszenzgekoppelten Antikörpern angefärbt, mit FlowJo ausgewertet und mit GraphPad dargestellt.

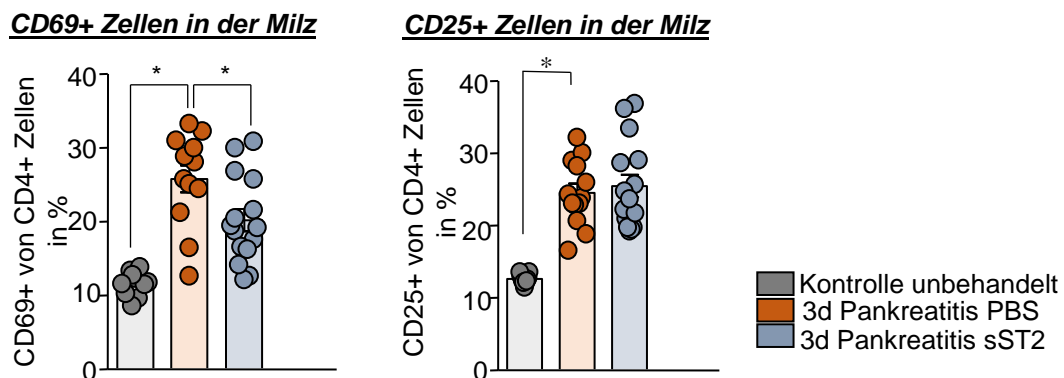


Abb.36: Um die Aktivierung des adaptiven Immunsystems zu messen, wurden CD69 und CD25 gefärbt und in FACS Analysen ausgewertet. In Grau sind Tiere an Tag 0 dargestellt (n=9), in Orange die Tiere an Tag 3, die eine Gangligatur induziert und PBS injiziert bekamen (n=12) und in Blau die Tiere an Tag 3, die eine Gangligatur induziert und zusätzlich sST2 injiziert bekamen (n=15).

Es war zu beobachten, dass beide Aktivierungsmarker bei Tieren mit Pankreatitis (orange, blau) verglichen zu den Kontrolltieren, die nicht operiert wurden (grau), signifikant anstiegen. CD69 als Aktivierungsmarker zeigt in der Gruppe, die mit sST2 behandelt wurde (blau) einen signifikant geringeren Anstieg im Gegensatz zur mit PBS behandelten Gruppe

(orange). Im Falle von CD25 konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen gemessen werden.

4.5.2.3 T-Zell-Differenzierung im sST2-Modell während der akuten Pankreatitis

Neben der Untersuchung der Aktivierung der T-Zellen über die Aktivierungsmarker CD69 und CD25, wurde ebenfalls die T-Zell-Differenzierung während der akuten Pankreatitis untersucht. T-Zellen werden als naive T-Zellen aus dem Thymus ausgeschleust und je nach Antigen und Zytokinumgebung differenzieren sie in unterschiedliche Subtypen der T-Zellen. Als Subtypen gibt es unter anderem Th1-, Th2-, Th17- und regulatorische T-Zellen (Tregs). Um die Differenzierung der T-Zellen zu untersuchen, wurden ebenfalls aus der Milz isolierte Splenozyten mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt, anschließend im FlowJo ausgewertet und mit GraphPad dargestellt.

Regulatorische T-Zellen (Tregs) wurden als CD4+CD25+FoxP3 charakterisiert. Th1-Zellen wurden als CD4+Tbet+ charakterisiert und Th2-Zellen als CD4+Gata3+ Zellen. Als dritte T-Helferzell Population wurden die Th17-Zellen als CD4+Roryt+ Zellen dargestellt.

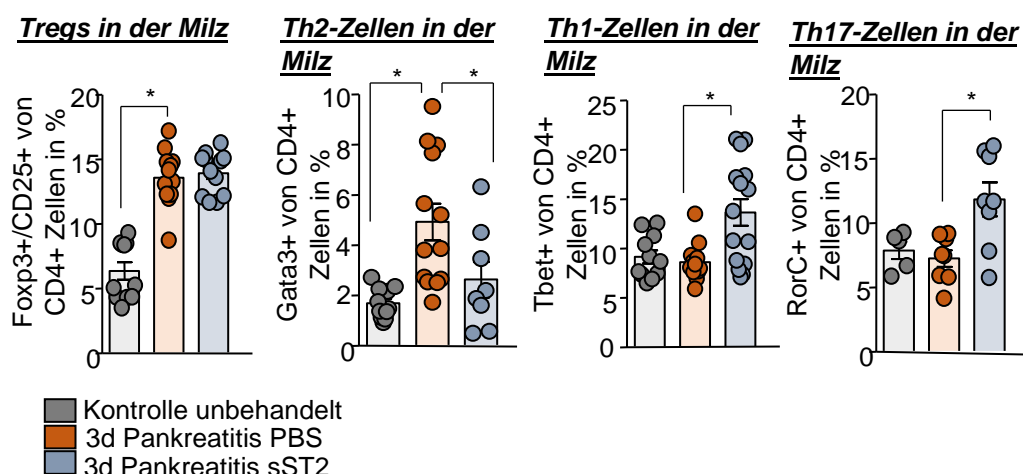


Abb.37: Die T-Zellen des adaptiven Immunsystems können in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Um diese darzustellen wurden verschiedene Marker gefärbt und im FACS analysiert. Tregs wurden als CD25+CD4+FoxP3+ dargestellt. Th2-Zellen wurden als CD4+Gata3+, Th1-Zellen als CD4+Tbet+ und Th17-Zellen als CD4+RoyC+ dargestellt. In Grau sind Tiere an Tag 0 dargestellt (n=8), in Orange die Tiere an Tag 3, die eine Gangligatur induziert und PBS injiziert bekamen (n=12) und in Blau die Tiere an Tag 3, die eine Gangligatur induziert und zusätzlich sST2 injiziert bekamen.

Es konnte gemessen werden, dass Tregs und Th2-Zellen während der Pankreatitis in den mit PBS behandelten Tieren (orange) signifikant anstiegen im Vergleich zu den nicht operierten Kontrolltieren (grau). Die Tiere, die mit sST2 behandelt wurden, zeigten keinen Unterschied in Bezug auf die Tregs. Bei den Th2-Zellen war jedoch eine signifikante Reduktion der Th2-Zellen im Vergleich zu der PBS Gruppe zu beobachten. Die Th1- und Th17-Zellen stiegen im Vergleich von Kontrolltieren zu PBS behandelten Tieren nicht an (grau vs. orange). Jedoch war ein signifikanter Anstieg der Zellen in den sST2-behandelten Tieren verglichen mit den PBS Tieren zu beobachten (blau vs. orange).

4.6 IL33^{-/-} Modell – akute Pankreatitis mittels Gangligatur

IL33 kann während einer Inflammation als Alarmin oder als Transkriptionsfaktor wirken. Um zu untersuchen, welchen Effekt IL33 in der akuten Pankreatitis hat, wurden IL33 knock-out (IL33^{-/-}) Tiere verwendet und die Daten wurden mit Daten von Wildtypmäusen verglichen. IL33^{-/-} Tiere sind genetisch so modifiziert, dass Zellen, die IL33 exprimieren, an dieser Stelle kein IL33 mehr produzieren, sondern β -Galactosidase. Bei diesen Tieren wurde in Intron 1 ein Insert (Gt Vektor 76) eingefügt, welches ein Stopcodon für IL33 enthält und das LacZ Gen, welches für die β -Galactosidase Produktion verantwortlich ist. Um zu untersuchen, welchen Einfluss IL33 nicht nur als Alarmin, sondern gleichzeitig als Transkriptionsfaktor auf die akute Pankreatitis hat, wurde IL33^{-/-} Tieren mittels Gangligatur eine schwere akute Pankreatitis induziert. An Tag 2 nach Gangligatur wurde 50 mg/kg Körpergewicht Caerulein i.p. gespritzt und an Tag 3 wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und aufgearbeitet.

4.6.1 Schweregrad der akuten Pankreatitis im IL33^{-/-} Modell

Um den Schweregrad der induzierten akuten Pankreatitis zu bestimmen, wurden Amylase und Lipase im Serum und MPO in der Lunge gemessen.

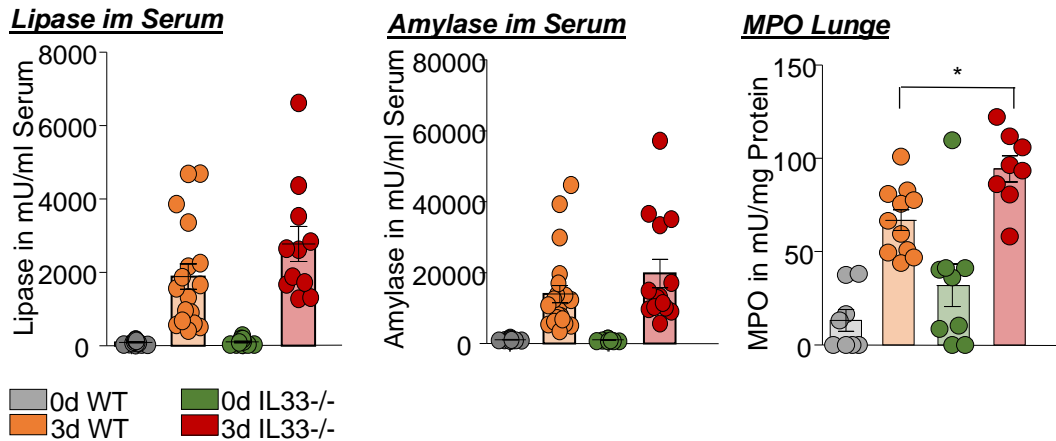


Abb. 38: Um den Schweregrad der akuten Pankreatitis nach Gangligatur im IL33^{-/-} Modell zu bestimmen, wurden Serum Amylase und Lipase gemessen und in GraphPad dargestellt. Zusätzlich wurde die MPO in der Lunge gemessen, um den Schaden der Lunge darzustellen. In Grau ist die Gruppe der Wildtypen an Tag 0 zu sehen (n=8), in Orange die Wildtypen an Tag 3 nach Gangligatur (n=17/11), in Grün die IL33^{-/-} Mäuse an Tag 0 (n=9) und in Rot an Tag 3 nach Gangligatur (n=11/8).

Sowohl die Serum-Amylase, als auch die Serum-Lipase waren an Tag 3 nach Gangligatur in der Gruppe der Wildtypen und IL33^{-/-} Tiere signifikant erhöht (orange, rot). Zwischen den Gruppen war jedoch nur eine leichte Tendenz zu erkennen. Die Werte der Serum-Amylase und Lipase waren in der Gruppe der IL33^{-/-} Tiere leicht erhöht im Vergleich zu der Gruppe der Wildtypen (rot vs. orange). Anhand der Lungen-MPO war zu beobachten, dass diese in beiden Gruppen an Tag 3 nach Gangligatur anstieg. In der Gruppe der IL33^{-/-} Tiere war im Vergleich zu den Wildtypen jedoch ein signifikant höherer Wert zu messen.

4. Ergebnisse

Zusätzlich wurden Schnitte der Pankreata mit H&E gefärbt, im SlideScanner visualisiert und mit der Pattern-QuantCenter-Software von Sysmex ausgewertet.

Schaden im Pankreas

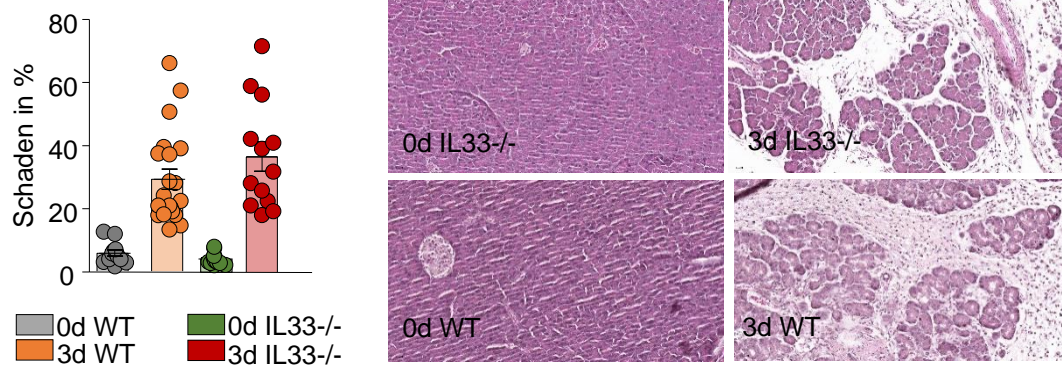


Abb. 39: Um den Pankreasschaden zu visualisieren, wurden die Pankreata in Paraffin eingebettet und in 3 μ m dicke Schnitte geschnitten. Anschließend wurden diese H&E gefärbt und mittels SlideScanner visualisiert. Der Schaden wurde mit der Quant-Center-Pattern-Software von Sysmex ausgewertet und mit Graphpad dargestellt. In Grau ist die Gruppe der Wildtypen an Tag 0 zu sehen (n=8), in Orange die Wildtypen an Tag 3 nach Gangligatur (n=19), in Grün die IL33-/- Mäuse an Tag 0 (n=6) und in Rot an Tag 3 nach Gangligatur (n=13).

Auch hier war zu beobachten, dass der Schaden in beiden Gruppen an Tag 3 signifikant ansteigt. Zwischen den Gruppen an Tag 3 war jedoch kein Unterschied zu sehen.

4.6.2 Angeborenes Immunsystem in der akuten Pankreatitis im IL33^{-/-} Modell

Um die Zellen des angeborenen Immunsystems, speziell die Population der Makrophagen, zu untersuchen wurden die Makrophagen Marker CD11b, CD163 und CD206 im FACS anhand gefärbter Splenozyten untersucht und ausgewertet.

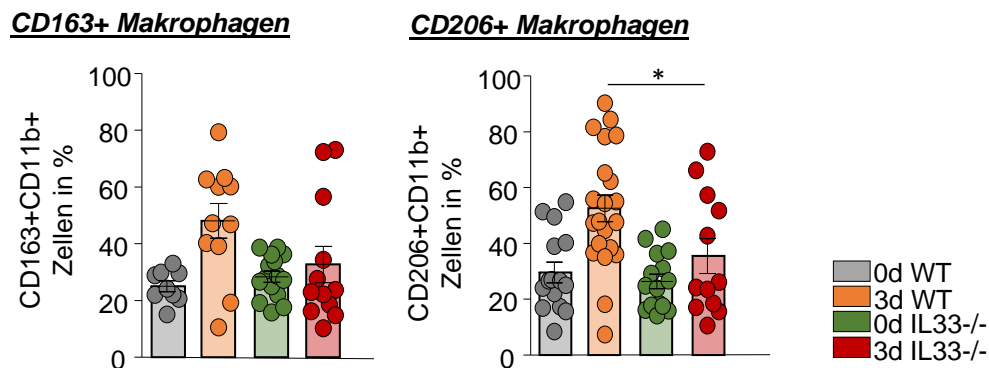


Abb. 40: Um das angeborene Immunsystem während der akuten Pankreatitis im IL33 knock-out Modell zu untersuchen, wurden Splenozyten isoliert, gefärbt und im FACS gemessen. Dabei wurden CD11b, CD163 und CD206 als Makrophagenmarker gefärbt und analysiert. Die Analyse erfolgte mit DIVA und die Darstellung mittels GraphPad. In Grau ist die Gruppe der Wildtypen an Tag 0 zu sehen (n=9/13), in Orange die Wildtypen an Tag 3 nach Gangligatur (n=11/21), in Grün die IL33^{-/-} Tiere an Tag 0 (n=14) und in Rot an Tag 3 nach Gangligatur (n=12).

Anhand der Untersuchung der Makrophagen im Verlauf der akuten Pankreatitis im IL33^{-/-} Modell war zu beobachten, dass die Makrophagen an Tag 3 der akuten Pankreatitis in beiden Gruppen anstiegen (orange, rot vs. grau, grün). Jedoch war zu sehen, dass an Tag 3 in der Gruppe der IL33^{-/-} Tiere verglichen mit den Wildtypen an Tag 3 sowohl weniger CD163⁺ als auch CD206⁺ Makrophagen gemessen wurden (rot vs. orange).

4.7. Die Rolle von IL33 in der akuten Pankreatitis im Organschaden

Um zu untersuchen, welchen Effekt IL33 während der akuten Pankreatitis auf den Organschaden hat, wurde in IL33^{-/-} Mäusen mittels Gangligatur eine schwere akute Pankreatitis induziert. Drei Tage nach Ligatur wurden die Tiere getötet und Lunge und Nieren wurden entnommen. Die Organe wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und gefärbt, um den Schaden zu untersuchen. Eine Niere wurde zusätzlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für RNA Analysen verwendet.

4.7.1 Die Rolle von IL33 im Lungenschaden während der akuten Pankreatitis

Um den Schaden in der Lunge zu untersuchen wurden Schnitte angefertigt und mittels H&E gefärbt. Die Schnitte wurden eingescannt und mit der Pattern-QuantCenter-Software von Sysmex ausgewertet. Es wurden der alveoläre Freiraum und das Gewebe ausgemessen, analysiert und in GraphPad dargestellt.

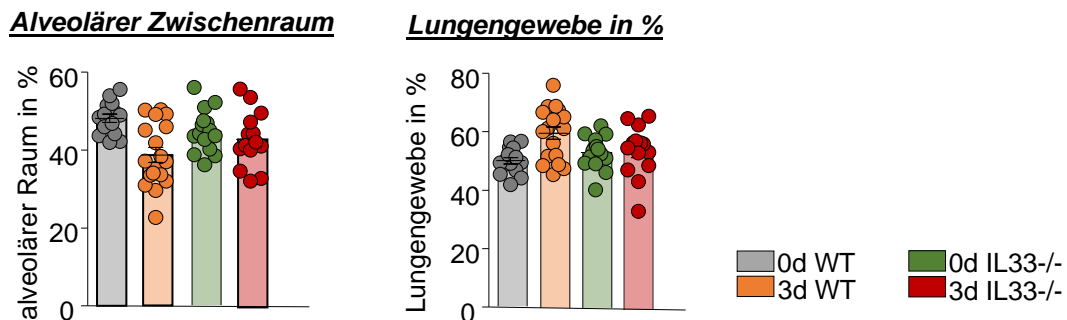


Abb. 41: Um den Schaden in der Lunge zu analysieren, wurden Lungen in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit H&E gefärbt. Anschließend wurden sie im SlideScanner gescannt und mit der QuantCenter-Pattern-Software ausgewertet. Dabei wurde zum einen der alveoläre Zwischenraum und zum anderen das Lungengewebe quantifiziert und in GraphPad dargestellt. In Grau ist die Gruppe der Wildtypen an Tag 0 zu sehen (n=13), in Orange die Wildtypen an Tag drei nach Gangligatur (n=17), in Grün die IL33^{-/-} Mäuse an Tag 0 (n=12) und in Rot an Tag 3 nach Gangligatur (n=14).

Hierbei war zu beobachten, dass der alveoläre Zwischenraum sowohl im Wildtyp als auch im IL33^{-/-} an Tag 3 nach Gangligatur abnahm (orange und rot vs. grau und grün). Im Umkehrschluss nahm das Lungengewebe an Tag 3 nach Induktion der akuten Pankreatitis zu. Im IL33^{-/-} Modell war zu

4. Ergebnisse

beobachten, dass der alveoläre Zwischenraum nicht so stark abnahm wie in den Wildtypen (rot vs. orange). Diese Tendenz ließ sich ebenso im Gewebe messen. In den IL33^{-/-} Tieren war an Tag 3 nach Gangligatur weniger Gewebe in % zu sehen als in den Wildtypmäusen an Tag 3.

Zusätzlich wurde in Lungenschnitten CD11b als Marker für Monozyten/Makrophagen gefärbt, um zu überprüfen, ob IL33 einen Effekt auf die Infiltration dieser Zellen in die Lunge hat.

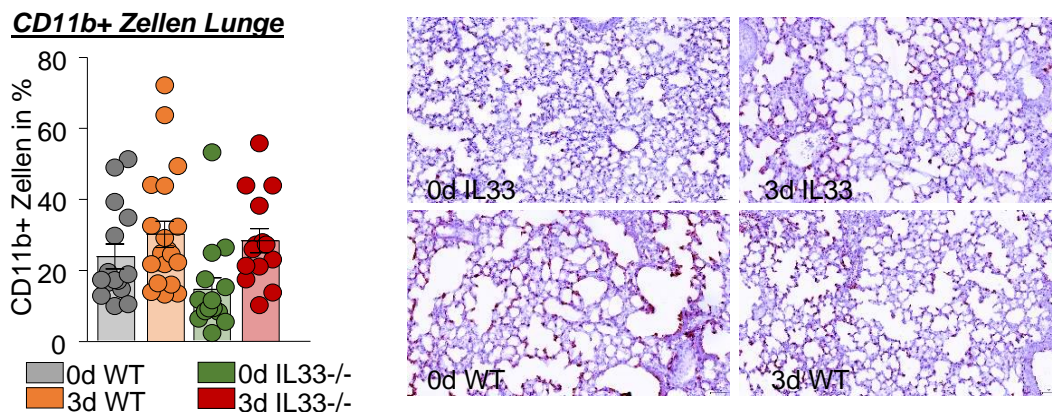


Abb. 42: Um den Einfluss von IL33 auf die Monozyten in der Lunge zu untersuchen, wurde CD11b mittels IHC in Paraffinschnitten angefärbt. Die Schnitte wurden im SlideScanner visualisiert, mit der QuantCenter Software von Sysmex ausgewertet und im GraphPad dargestellt. In Grau ist die Gruppe der Wildtypen an Tag 0 zu sehen (n=13), in Orange die Wildtypen an Tag 3 nach Gangligatur (n=18), in Grün die IL33^{-/-} Mäuse an Tag 0 (n=13) und in Rot an Tag 3 nach Gangligatur (n=12).

Es war zu sehen, dass die CD11b+ Monozyten an Tag drei nach Gangligatur ansteigen (orange, rot). In den IL33^{-/-} Tieren sind die Monozyten sowohl an Tag 0 als auch an Tag 3 geringer als in den Wildtypen.

4.7.2 Die Rolle von IL33 im Nierenschaden während der akuten Pankreatitis

Um den Nierenschaden zu untersuchen, wurde RNA aus den Nieren isoliert und NGAL wurde als Nierenschadensmarker mittels qrt-PCR analysiert. Zusätzlich wurde der Kreatininwert im Serum bestimmt. Erhöhtes Kreatin im Serum deutet auf einen Nierenschaden hin.

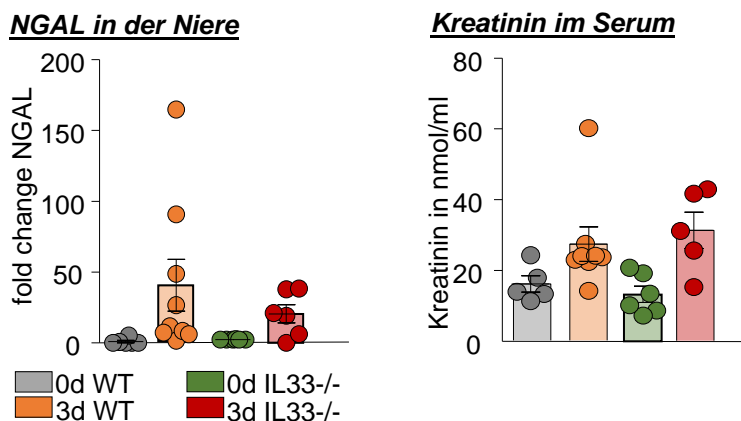


Abb 43: Um den Nierenschaden in der akuten Pankreatitis zu überprüfen, wurden als Nierenschadensmarker NGAL in qrt-PCR-Analysen in der Niere und Kreatinin mittels ELISA im Serum gemessen. In Grau ist die Gruppe der Wildtypen an Tag 0 zu sehen (n=5), in Orange die Wildtypen an Tag drei nach Gangligatur (n=9), in Grün die IL33^{-/-} Mäuse an Tag 0 (n=6) und in Rot an Tag drei nach Gangligatur (n=6/5).

Die qrt-PCR-Analysen von NGAL zeigten, dass dieses an Tag 3 nach Induktion der Pankreatitis anstieg. Sowohl in der Gruppe der Wildtypen als auch in der Gruppe der IL33^{-/-} Tiere war ein deutlicher Anstieg zu messen (orange und rot vs. grau und grün). In der Gruppe der IL33^{-/-} Tiere war im Vergleich zu den Wildtypentieren ein geringerer Anstieg an Tag 3 zu sehen (rot vs. orange).

Die Messung von Kreatinin im Serum zeigte ebenfalls, dass die Konzentration von Kreatinin an Tag 3 nach Pankreatitis in beiden Gruppen anstieg.

5. Diskussion

5.1 Organschaden in der akuten Pankreatitis

Während der akuten Pankreatitis kommt es in bis zu 20 % der Fälle zu einem schweren Verlauf, der mit schweren Komplikationen, wie z.B. Organversagen einhergehen kann (1). Dabei kommt es häufig zu renalen und respiratorischen Dysfunktionen. Das akute Nierenversagen (*acute kidney injury* – AKI) tritt in bis zu 70 % der Fälle bei schwerer akuter Pankreatitis auf (69). Auch respiratorische Komplikationen treten während der schweren akuten Pankreatitis sehr häufig auf (95). Es wird vermutet, dass in das Lungengewebe infiltrierende Immunzellen für pulmonare Komplikationen verantwortlich sind (53). Eine belegte Erklärung für den Organschaden, der im Zuge der schweren akuten Pankreatitis auftritt, gibt es jedoch nicht. Eine Ursache dafür ist ein Mangel an tierexperimentellen Modellen, die die Situation im Patienten widerspiegeln.

In dem hier verwendeten Mausmodell der schweren akuten Pankreatitis sind anhand von H&E-Färbungen von Lunge und Niere deutliche Veränderungen zu erkennen. In der Lunge zeigen die analysierten Parameter, wie Lungengewebe und alveolärer Zwischenraum in Prozent, dass der Anteil an Gewebe in den Lungen drei Tage nach Induktion der akuten Pankreatitis zunimmt, während der alveoläre Zwischenraum dementsprechend abnimmt. Es ist bereits beschrieben, dass sich die Lungenstrukturen während der akuten Pankreatitis dahingehend verändern, dass sich Ödeme bilden und Leukozyten einwandern (96). Diese Veränderungen sehen wir ebenfalls in den H&E-Färbungen der Tiere drei Tage nach Induktion der Pankreatitis. Die alveolären Wände schwellen an und verdicken sich (siehe Abb. 9). Zudem wandern Leukozyten in die Lunge ein und sind als Infiltrat deutlich zu erkennen.

Als Marker für einen akuten Nierenschaden kann die Expression von NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) gemessen werden (97). NGAL ist ein Protein, das unter anderem von Nierentubuli produziert wird. Es wird als Reaktion auf geschädigte Zellen exprimiert und dient zum Schutz der

Zellen durch die Aktivierung von spezifischen Eisen abhängigen Pathways, die ebenfalls für das Nierenwachstum und die Differenzierung verantwortlich sind (97). Die NGAL-Level korrelieren deutlich mit der Schwere des renalen Schadens (97). Drei Tage nach Induktion der akuten Pankreatitis ist eine signifikante Erhöhung der Genexpression von NGAL in den Nieren zu beobachten. Ebenfalls ist in den H&E-Färbungen eine Auflockerung des Gewebes und Schaden in den Nierentubuli zu sehen (siehe Abb. 10). *Renal ischemia/reperfusion injury* (IRI) geht oft einher mit Multiorganversagen oder Sepsis (98). Als Konsequenz der Nierenischämie entsteht das akute Nierenversagen (AKI) (99). Zudem kann als Marker des Nierenschadens Kreatinin im Serum gemessen werden (69). Auch in unserem Modell der schweren akuten Pankreatitis ist an Tag 3 nach Induktion zu beobachten, dass die Werte im Serum erhöht sind. Durch die Erhöhung des NGAL, des Serumkreatinins und der Veränderung der Gewebestruktur konnten wir zeigen, dass es im Verlauf der akuten Pankreatitis im Mausmodell, induziert durch eine Gangligatur, zu einem Nierenschaden kommt. Mit Hilfe des Tiermodells können nun die Ursachen für den Organschaden im Zuge der schweren akuten Pankreatitis näher charakterisiert werden, um so letztendlich auch die Situation im Patienten besser verstehen und behandeln zu können.

5.2 Makrophagen in der akuten Pankreatitis

Es ist bekannt, dass Makrophagen während der akuten Pankreatitis auf Grund des Pankreasschadens in das geschädigte Organ einwandern und vermehrt Zytokine freisetzen, die die bereits bestehende Immunreaktion noch weiter verstärken (3). Dabei können Makrophagen unterschiedlich wirken. Einerseits als M2-Typ-Makrophagen die einen anti-inflammatorisch geprägten Phänotyp besitzen und als M1-Typ-Makrophagen, die vermehrt pro-inflammatorisch agieren (3). Ebenso sind alveoläre Makrophagen beschrieben, die während der akuten Pankreatitis in der Lunge zu finden sind. Die Daten lassen vermuten, dass Makrophagen über die Expression von NO (Stickstoffmonoxid) eine schädigende Rolle im Lungenschaden

spielen (100). Drei Tage nach Induktion der akuten Pankreatitis konnten wir Makrophagen in der Lunge nachweisen (siehe Abb.11). Vor allem M2-Makrophagen, die sich durch die Expression von CD206 und CD163 auszeichnen, stiegen nach drei Tagen signifikant an. Die Makrophagen in der Lunge zeigen eine eher anti-inflammatorische Ausrichtung. Zusätzlich sind signifikant mehr Makrophagen zu sehen, die CD62L+ sind. CD62L (L-Selektin) ist ein Oberflächenprotein auf Zellen, das bei der Aktivierung der Zellen abgespalten wird. Es ist ein transmembran Adhäsionsmolekül, das auf den meisten zirkulierenden inaktivierten Leukozyten exprimiert wird (101). Dieses Molekül erlaubt es inaktiven Zellen in das Gewebe einzudringen. Die Erkenntnisse, dass die Makrophagen an Tag 3 der akuten Pankreatitis im Mausmodell in der Lunge CD62L+ sind, also inaktiviert, weisen darauf hin, dass es sich hierbei um zirkulierende Monozyten handelt, die eine Rolle für den Lungenschaden während der akuten Pankreatitis spielen.

5.3 Neutrophilen- und Monozyten- Depletion in der akuten Pankreatitis

Neutrophilen wandern schon nach kurzer Zeit im Verlauf der akuten Pankreatitis in das Pankreas und die Lunge ein. Sie sind bekannt dafür, den Schaden während der akuten Pankreatitis zu verstärken bzw. in der Lunge zu verursachen (102). Inoue et al zeigten 1995, dass der Lungenschaden in der schweren akuten Pankreatitis milder wurde, als sie die Neutrophilen depletierten (103). Gukovskaya et al zeigten 2002 ebenfalls, dass der Pankreasschaden in der akuten Pankreatitis in Ratten durch eine Neutrophilen-Depletion geringer wurde. Sie konnten zeigen, dass durch die Depletion von Neutrophilen die Aktivierung von Trypsin im Pankreas gedämpft wurde (54). Auch für Makrophagen konnte gezeigt werden, dass sie zügig in das Pankreas migrieren und über die Sekretion von TNF α den lokalen Schaden und auch die Proteaseaktivierung vorantreiben können (104,105). Mittels anti-CCR2-Antikörper und anti-Ly6G-Antikörper konnten Monozyten und Neutrophilen während der akuten Pankreatitis im Mausmodell erfolgreich depletiert werden. Die Ly6G+ Zellen konnten mit

Hilfe des anti-Ly6G-Antikörpers in der Lunge und Milz fast komplett depletiert werden (siehe Abb.14). Das zeigt, dass der Antikörper funktioniert. Ebenso waren die CD11b+ Zellen in der Lunge und Milz deutlich reduziert (siehe Abb. 15), was bedeutet, dass der anti-CCR2-Antikörper ebenfalls funktioniert und die Monozyten depletiert werden konnten. Im Gegensatz zu Gukovskaya et al. und Inoue et al. konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, dass die Schweremarker Amylase und Lipase, die genutzt werden, um den Schaden des Pankreas zu bestimmen, reduziert sind (siehe Abb. 16). Somit zeigten diese Daten keine Reduktion des Pankreasschadens während der akuten Pankreatitis unter Neutrophilen- und Monozyten-Depletion. Diese Zellen scheinen im Modell der Gangligatur nicht den entscheidenden Effekt auf den Schaden im Pankreas zu haben. Gukovskaya et al und Inoue et al zeigten ihre Ergebnisse in der Caerulein induzierten Pankreatitis (54). Ebenso zeigten Tsuji et al. 2012, dass die Pankreatitis in CCR2-defizienten Tieren im Modell der leichten Caerulein-vermittelten Pankreatitis einen leichteren Verlauf hatte (106). Die Unterschiede im Modell und somit in der Schwere der akuten Pankreatitis können dazu führen, dass Neutrophile und Monozyten einen anderen Effekt zeigen. Das Modell der Gangligatur führt zu einem schwereren Verlauf der akuten Pankreatitis und somit kann es zu einer veränderten Immunantwort kommen.

Um den Schaden während der akuten Pankreatitis in der Lunge zu ermitteln, wird als Marker Myeloperoxidase (MPO) gemessen (107). Die MPO ist ein lysosomales Enzym aus der Gruppe der Peroxidasen und kommt in Neutrophilen und Monozyten vor (108). Drei Tage nach Induktion der akuten Pankreatitis ist zu sehen, dass die MPO in der Lunge signifikant ansteigt (siehe Abb. 18). Diese Daten zeigen, dass es einen eindeutigen Schaden in der Lunge gibt. Jedoch ist kein Unterschied zwischen den Gruppen nach drei Tagen, unbehandelt, Monozyten depletiert und Neutrophilen depletiert zu sehen. In der Sauerstoffsättigung jedoch ist ein deutlicher Unterschied zu sehen. Die Sauerstoffsättigung im Blut gibt Aufschluss über die Lungenfunktion. Depletiert man die Monozyten, so ist die Sauerstoffsättigung deutlich höher als in der unbehandelten Gruppe oder der Gruppe ohne Neutrophilen (siehe Abb. 18). Diese Daten lassen

vermuten, dass die MPO nicht der richtige Marker ist, um den Lungenschaden oder die Lungenfunktion zu bestimmen. Die MPO zeigt lediglich die Infiltration von Neutrophilen und Monozyten an, scheint aber keine zuverlässige Auskunft über den Schaden zu geben. Dies kann darin begründet liegen, dass die MPO nur als Marker für die Anwesenheit von Leukozyten dient, jedoch keinen Aufschluss über deren Aktivität bzw. Ausrichtung (M1/M2 bzw. pro- bzw. anti-inflammatorisch) gibt. Dass die Sauerstoffsättigung durch die Monozyten-Depletion positiv beeinflusst wird, lässt vermuten, dass Monozyten eine kritische Rolle im Lungenschaden während der akuten Pankreatitis spielen. Diese Vermutungen lassen sich auf den Schaden der Niere übertragen, da auch hier zu sehen ist das NGAL und Serumkreatinin, die als Schadensmarker der Niere gemessen werden können (97), in der Gruppe der Tiere mit Monozyten-Depletion an Tag 3 reduziert sind (siehe Abb. 19).

5.4 Monozyten in der akuten Pankreatitis

Die Analyse der Makrophagen in der Lunge ergab, dass es sich um nicht aktivierte CD11b+CD62L+ Zellen handelt. Diese Marker deuten darauf hin, dass es sich hierbei um Monozyten handelt. In der Real-Time-Deformability-Cytometry (RT-DC), die dazu dient die strukturellen und physikalischen Eigenschaften von Zellen zu bestimmen (94), wurden die Monozyten vermessen und analysiert. Die Monozyten, die an Tag 3 der akuten Pankreatitis im Mausmodell zu messen sind, sind signifikant größer als in den gesunden Tieren (siehe Abb. 12). Diese Erkenntnisse mit der Tatsache, dass die Zellen in der Lunge CD62L+ sind, lassen vermuten, dass die Monozyten die Gefäße während der akuten Pankreatitis blockieren und es somit zum ischämischen Lungenschaden kommt. Auch in anderen Erkrankung, wie z.B. der pulmonalen Hypertension konnte bereits gezeigt werden, dass zirkulierende Monozyten, die in die Lunge einwandern und dort perivaskulär zu Makrophagen differenzieren, maßgeblich zu dieser Erkrankung beitragen (109). Die Deformation der Monozyten ist ebenso signifikant erhöht (siehe Abb. 12) und durch das niedrigere Elastic Modulus

nach drei Tagen ist gezeigt, dass die Deformation tatsächlich eine strukturelle Ursache ist, und nicht durch die Größe der Zellen verursacht wird (94). Sowohl in der Lunge als auch in den Nierentubuli konnten CD11b+ Zellen gefärbt werden. Diese sind nach drei Tagen der akuten Pankreatitis in beiden Organen signifikant erhöht (siehe Abb. 13). Aus den vorherigen Erkenntnissen lässt sich vermuten, dass es sich um Monozyten handelt. In der Lunge konnte gezeigt werden, dass diese größer sind als in gesunden Tieren. In der Niere sind ebenfalls Monozyten zu finden, die vermutlich die gleiche Tendenz haben. Daraus lässt sich schließen, dass es ebenso durch Monozyten zu einem ischämischen Nierenschaden kommt und somit zum akuten Nierenversagen in der akuten Pankreatitis.

5.5 IL33-Expression in der akuten Pankreatitis

Interleukin 33 ist ein Zytokin der IL1-Familie und kann als Transkriptionsfaktor (78) oder als Alarmin wirken (76). Es kann von Makrophagen und geschädigten Epithelzellen freigesetzt werden und wirkt auf Zellen, die den ST2-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren (76). Während der akuten Pankreatitis konnte bereits gezeigt werden, dass IL33 ansteigt (90). In dieser Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass IL33 im Modell der akuten Pankreatitis von Makrophagen exprimiert wird (siehe Abb. 20/21). Über die Behandlung von Makrophagen mit LPS wurde eine typische Inflamationsreaktion hervorgerufen. LPS ist ein Oberflächenprotein auf Bakterien und verursacht eine typische M1-Makrophagenantwort vermittelt über den Toll-like-Rezeptor-Signalweg (110). Die *in vitro* Nachstellung der akuten Pankreatitis geschieht über die Co-Inkubation von Makrophagen mit CCK-stimulierten Azinuszellen (111). Mit Hilfe einer mRNA-Chipanalyse konnte gezeigt werden, dass die Makrophagenantwort in der akuten Pankreatitis keiner typischen M1-Typ-Antwort entspricht. Es werden verschiedene Zytokine hochreguliert und es ist zu beobachten, dass IL33 exklusiv in den Makrophagen, die mit CCK stimulierten Azinuszellen co-inkubiert wurden, hochreguliert ist. Die X-Gal Färbung in IL33-Rezeptor knock-out Mäusen zeigt, dass IL33 tatsächlich von Makrophagen exprimiert wird, die in das Gewebe einwandern (siehe

Abb. 23-25). Ebenfalls ist zu beobachten, dass IL33 nicht von Azinuszellen exprimiert wird (siehe Abb. 22). Kempuraj et al zeigten 2013 ebenfalls, dass IL33 positive Leukozyten in das Pankreas und in die Lunge einwandern (90). Masamune et al zeigten 2010 jedoch, dass IL33 in Pankreaszellen, wie Sternzellen und Azinuszellen exprimiert wird (112). Auch andere Gruppen, wie zum Beispiel die Gruppe um Ouziel et al. zeigten 2012, dass Azinuszellen IL33 exprimieren (89). Diese Gruppen, die zeigten, dass IL33 in den Azinuszellen exprimiert wird, wiesen das IL33 mit Hilfe von Antikörpern nach. Sie führten IHC-Färbungen, ELISA oder Westernblot durch. Dabei kann es zu Fehlbindungen und somit zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Das Modell des IL33^{-/-} Stammes, der es ermöglicht IL33 mit Hilfe von X-Gal zu färben (siehe Abb. 23-31), scheint zuverlässiger und genauer zu sein. In diesem Modell wird von IL33 exprimierenden Zellen β -Galactosidase exprimiert und kein IL33. Bei diesen Tieren wurde in Intron 1 ein Insert (Gt Vektor 76) eingefügt, welches ein Stopcodon für IL33 enthält und das LacZ Gen, welches für die β -Galactosidase Produktion verantwortlich ist (113). Die Zellen werden mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) gefärbt. Das Enzym β -Galactosidase hydrolysiert X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl (5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol). Das 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird vom Sauerstoff der Luft zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert (113).

5.6 sST2-Modell in der akuten Pankreatitis

sST2 ist der lösliche Rezeptor von IL33. Es ist eine Isoform des ST2-Gens, die keine transmembran und zytoplasmatische Domäne hat (114). sST2 wirkt als Decoy-Rezeptor und kann auf diesem Wege freies IL33 binden und somit die Wirkung des Zytokins über den membranständigen ST2-Rezeptor, der sich auf den Immunzellen befindet, blockieren (114). Im Modell der akuten Pankreatitis wurden bereits ST2^{-/-} Modelle verwendet.

In ST2^{-/-} Mäusen wurde gezeigt, dass ST2 und somit IL33 wohl eine protektive Rolle während der akuten Pankreatitis hat. Ouziel et al. konnten 2012 zeigen, dass die akute Pankreatitis in ST2^{-/-} Tieren einen schwereren

Verlauf hatte, was zur Annahme führt, dass der ST2/IL33-Pathway eine protektive Rolle während der akuten Pankreatitis spielt (77). Eine weitere Gruppen konnten jedoch zeigen, dass IL33 eine negative Rolle während der akuten Pankreatitis spielt (90). Die Gruppe um Samuel et al. zeigte 2013, dass IL33 zu einer Stimulation des pro-inflammatorischen Pathways in Azinuszellen führt und somit die Entzündungsreaktion in der akuten Pankreatitis erhöht. Samuel et al. bewerteten die kontroversen Daten als möglich, da es im ST2-/- schon in der frühen Entwicklung zu einem Phänotyp kommt, der auf der Abwesenheit des IL33 Signalweges basiert (90).

Die Gruppe um Li et al. zeigten 2018, dass eine Adenovirus-vermittelte Überexpression von sST2 im Modell der Taucholat Pankreatitis (SAP) zu einem milderen Verlauf der Pankreatitis führt (115).

Auch im Modell der Gangligatur ist nun zu sehen, dass die i.p. Injektion von sST2 eine protektive Rolle hat. Die Schweregradmarker im Pankreas (Amylase und Lipase) und der Infiltrationsmarker in der Lunge (MPO) sind reduziert (siehe Abb. 32-34), und das angeborene Immunsystem ist gedämpft (siehe Abb. 35). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass IL33 eine Pankreatitis verschlechternde Rolle spielt und in der Aktivierung und an der Anlockung der M2-Makrophagen während der akuten Pankreatitis beteiligt ist, was zu einer Verstärkung der akuten Pankreatitis führt. Im adaptiven Immunsystem in der Milz ist zu sehen, dass die Th2-Antwort mit der Gabe von sST2 abnimmt und die Th1- und Th17-Antwort zunimmt (siehe Abb. 37). Die Pro-Inflammation scheint an dieser Stelle protektiv zu sein. IL33 ist bekannt dafür, den anti-inflammatorischen Pathway zu triggern (80). Durch das Blocken des IL33 durch sST2 sind anti-inflammatorische Effekte unterdrückt und es kommt vermehrt zur pro-Inflammation. Die systemische Th1 und Th17 Immunantwort scheint im Modell der schweren, durch Gangligatur vermittelten, akuten Pankreatitis einen protektiven Effekt zu haben.

Auch in anderen Modellen und Erkrankungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Blockade von IL33 therapeutischen Nutzen hat. Alline et al. zeigten 2019 im Modell von chronischer Entzündung der Atemwege,

dass die Blockade von IL33 zu verminderter Leukozyteninfiltration führte und sich das Gewebe besser erholte (116). Ebenso konnte 2020 von Jin et al. gezeigt werden, dass die Blockade zu einem verbesserten Outcome der bronchopulmonalen Dysplasie führte (117). Wang et al. zeigten 2017, dass die Blockade des Zytokins IL33 Tumorwachstum unterdrücken konnte. Sie zeigten, dass die Blockade zu verminderter Tumor assoziierter M2-Makrophagen-Polarisierung und verminderter T-Zell Ansammlung führte (118).

5.7 Akute Pankreatitis im IL33-/- Modell

Um die Wirkung von IL33 im Modell der akuten Pankreatitis zu überprüfen, wurden bereits verschiedene Modelle untersucht. Es wurden Experimente im ST2-/- (89) oder mit einer sST2-Überexpression (115) durchgeführt. Daten zur schweren akuten Pankreatitis im Mausmodell unter Verwendung von IL33-/- Mäusen sind in der Literatur jedoch nicht zu finden.

Anhand von Schweregradmarkern wie der Serum Amylase und Lipase konnten wir keine Unterschiede in dem von uns verwendeten Modell der schweren akuten Pankreatitis feststellen (siehe Abb. 38). Mit Hilfe der MPO Messung in der Lunge konnte gezeigt werden, dass diese in der Gruppe der IL33-/- Tiere an Tag 3 etwas höher war als in den Wildtypmäusen an Tag 3 (siehe Abb. 38). Die Daten des angeborenen Immunsystems zeigten im IL33-/- die gleichen Ergebnisse wie im sST2 Modell. Die über CD206 und CD163 definierten M2-Makrophagen sind im Falle des IL33-/- an Tag 3 der akuten Pankreatitis im Vergleich zu den Wildtypmäusen deutlich reduziert (siehe Abb. 40).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der IL33-/- keinen deutlichen Effekt auf den direkten Organschaden im Pankreas (siehe Abb. 39) hat, jedoch auf die M2-Makrophagen-Polarisierung.

5.8 Die Rolle von IL33 im Organschaden

Da im Zuge dieser Arbeit im Mausmodell der schweren akuten Pankreatitis gezeigt werden konnte, dass Monozyten und Makrophagen eine wichtige Rolle im Organschaden spielen und IL33 Makrophagen beeinflusst, sollte überprüft werden, welchen Einfluss IL33 auf den Organschaden in der akuten Pankreatitis hat. Sowohl in der Lunge als auch in der Niere wurden Analysen durchgeführt. In der Lunge konnte mittels H&E-Färbung gezeigt werden, dass sich im Verlauf der akuten Pankreatitis an Tag 3 die Lungenstruktur verändert (siehe Abb. 9). An Tag 3 nach Induktion der schweren akuten Pankreatitis steigt der prozentuale Teil des Gewebes an, während der alveoläre Zwischenraum abnimmt. Im Vergleich von Wildtypmäusen und IL33^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, dass die IL33^{-/-} Tiere weniger alveolären Zwischenraum verlieren als die Wildtypmäuse (siehe Abb. 41). Es scheint so, dass der IL33^{-/-} knock-out einen geringen Einfluss auf den Lungenschaden hat. Der geringere Verlust des alveolären Zwischenraums im IL33^{-/-} Modell während der akuten Pankreatitis lässt vermuten, dass es zu einer geringeren Infiltration von Leukozyten in das Lungengewebe kommt und somit der prozentuale Anteil des Gewebes nicht so stark zunimmt im Vergleich zum Wildtypmodell.

Anhand von immunohistochemischen Färbungen von CD11b in der Lunge ist zu beobachten, dass in IL33 defizienten Tieren sowohl in der Gruppe von 0d als auch drei Tage nach Pankreatitis weniger CD11b⁺ Zellen nachzuweisen sind (siehe Abb.42) als in den Wildtyptieren. Jedoch sind diese Ergebnisse nicht signifikant und eher als Trend zu bewerten. Der IL33^{-/-} Knock-out scheint in diesem Modell nur einen marginalen Effekt auf die Einwanderung der CD11b⁺ Zellen in die Lunge zu haben.

Im Falle des Nierenschadens in der akuten Pankreatitis konnte im IL33^{-/-} Modell gezeigt werden, dass NGAL an Tag 3 in den IL33^{-/-} Tieren im Vergleich zu den Wildtypen leicht reduziert ist, das Serumkreatinin jedoch leicht erhöht ist (siehe Abb.43). Es sind widersprüchlicher Ergebnisse, die jedoch nur geringe Unterschiede aufzeigen, was zu dem Schluss führt, dass

5. Diskussion

der IL33-/- Knock-out keinen Effekt auf den Nierenschaden zu haben scheint.

Insgesamt zeigt der IL33-/- nur einen sehr geringen Effekt im Modell der schweren akuten Pankreatitis mittels Gangligatur. Im sST2 Modell ist jedoch ein Effekt in der Schwere der SAP zu erkennen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es im IL33-/- Modell, ähnlich wie im ST2-/- Modell (90), eventuell zu Kompensationsmechanismen kommt, da dieser Knock-out bereits in der Entwicklung der Tiere besteht. Im Modell der sST2-Zugabe entwickelten sich die Mäuse normal und die Immunantwort wurde erst mit der Zugabe des sST2 verändert.

6. Schlussfolgerung

Die schwere akute Pankreatitis ist auch heute noch eine lebensbedrohliche Erkrankung. Etwa 20 % der Patienten mit akuter Pankreatitis zeigen einen schweren Verlauf der Erkrankung, die mit systemischen Komplikationen, wie z.B. mit Organversagen, einhergehen kann. 15-55 % der Patienten zeigen pulmonale Dysfunktionen (5) und bis zu 70 % der Patienten mit einer schweren akuten Pankreatitis zeigen akutes Nierenversagen (69). Leukozyten infiltrieren das geschädigte Pankreas, die Lunge und die Nieren und verursachen Gewebeschaden (54). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in der Lunge und der Niere im Modell der akuten Pankreatitis, verursacht durch eine Gangligatur, an Tag 3 nach Induktion der Erkrankung zu strukturellen Veränderungen kommt (siehe Abb. 9/10). In der Lunge bilden sich Ödeme aus, die alveolären Wände werden dicker und Leukozyten wandern ein. Ebenso kommt es in der Niere zur Einwanderung von Leukozyten in die Glomeruli. Es konnte anhand dieser Arbeit gezeigt werden, dass es sich dabei um Monozyten handelt, die in Lunge und Niere einwandern und eine wichtige Rolle im Organschaden spielen. Eine Depletion von Monozyten, mit Hilfe des anti-CCR2-Antikörpers, wirkte sich protektiv aus und der Organschaden konnte reduziert werden (siehe Abb. 18/19). In der Lunge wurde mittels RT-DC gezeigt, dass die Monozyten in der akuten Pankreatitis größer sind als in der Lunge von gesunden Tieren.

Fasst man nun die Daten der Monozyten in der RT-DC mit den Daten der Monozyten- und Neutrophilen-Depletion zusammen, lässt sich vermuten, dass nicht die Neutrophilen, sondern die Monozyten die Ursache der systemischen Komplikationen und somit des Lungen- und Nierenschadens während der akuten Pankreatitis sind. Aus den Daten ergibt sich die Theorie, dass Monozyten während der akuten Pankreatitis massiv aus dem Knochenmark mobilisiert werden und kleine Gefäße blockieren, wie sie z.B. in der Lunge und Niere vorkommen. Ein Grund dafür ist der deutliche Größenunterschied der Zellen, im Vergleich zu gesunden Tieren (siehe Abb. 12).

6. Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass die Monozyten in der Lunge während der akuten Pankreatitis CD62L⁺ sind (siehe Abb. 11). Diese Monozyten besitzen also noch das L-Selektin, welches für das Rolling der Zellen an den Gefäßen verantwortlich ist (101), damit diese in das Gewebe eindringen können.

Diese Erkenntnisse führen zu der Theorie, dass es dadurch zum Anheften an die Gefäßwände und durch die Größe der Monozyten zur Blockade der Gefäße kommt, das wiederum zu Ischämien und anschließend zum Organschaden führt.

Die prophylaktische Behandlung der Tiere mit rekombinanten sST2 zeigte, dass die akute Pankreatitis bei einer Blockade von IL33 einen milderen Verlauf nahm. Die angeborene Immunantwort wurde in Bezug auf die Makrophagen reduziert (siehe Abb. 35). Das adaptive Immunsystem wurde in die Richtung einer Th1 und Th17 pro-inflammatorischen Immunantwort gedrückt. Jedoch zeigte das IL33^{-/-} Modell nur einen geringen bis gar keinen Effekt, was zu der Annahme führt, dass diese Tiere eventuell Kompensationsmechanismen entwickeln und dieser Knock-out im Modell der Gangligatur vermittelten schweren akuten Pankreatitis keinen Effekt hat.

In Bezug auf den Patienten und therapeutische Ansätze in der Klinik wäre eine Gabe oder Blockade des IL33 ohnehin ein interessanterer Ansatz. In Bezug auf den Einfluss des IL33 in der akuten Pankreatitis und die Idee dieses Zytokin zu manipulieren, um den Verlauf der akuten Pankreatitis zu mildern müssen also noch weitere Untersuchungen angestellt werden. In ersten Versuchen scheint es so, dass IL33 während der akuten Pankreatitis einen Einfluss hat und die Blockade zu einem leichteren Verlauf der akuten Pankreatitis führt.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Organschaden in Lunge und Niere und die Wirkung von Interleukin 33 (IL33) auf die Zellen des angeborenen Immunsystems und deren Einwanderung in verschiedene Organe während der schweren akuten Pankreatitis im Mausmodell untersucht. Die schwere akute Pankreatitis wurde mittels Gangligatur und einmaliger Gabe von Caerulein an Tag 2 nach Gangligatur induziert. An Tag 3 nach Induktion wurden die Mäuse getötet und die Organe wurden für weitere Analysen entnommen.

Am dritten Tag nach Induktion der Pankreatitis kam es zu einem Organschaden in der Lunge und den Nieren. In der Lunge fand sich eine Verdickung der Alveolarsepten und eine Verdichtung des Gewebes sowie eine Infiltration von Leukozyten und ein Ödem. In der Niere waren ebenfalls strukturelle Veränderungen zu finden und eine Infiltration von Leukozyten. In FACS Analysen der Lunge konnte beobachtet werden, dass CD11b+CD62L+ Monozyten während der akuten Pankreatitis signifikant anstiegen. Mittels RT-DC wurde gezeigt, dass diese Monozyten an Tag 3 signifikant an Größe zugenommen hatten. Mit einer CD11b Färbungen von Lungen und Nieren konnte die Infiltration durch Monozyten bestätigt werden. Unter einer Blockade von Monozyten durch systemische Gabe von anti-CCR2-Antikörpern verringerte sich die Schädigung in Lunge und Niere während der Pankreatitis signifikant.

Diese Daten legen nahe, dass der Organschaden in der schweren akuten Pankreatitis durch infiltrierende Monozyten verursacht wird, die über CD62L (L-Selektin) an die Gefäßwände binden, was in den Kapillaren zur Ischämie führt.

In vitro sezernierten Makrophagen, die mit CCK stimulierten Azinuszellen co-inkubiert wurden, IL33. Im Mausmodell wurde IL33 mittels sST2 blockiert, was die Schädigung des Pankreas in der Pankreatitis reduzierte. In IL33-depletierten Tieren fand sich im Vergleich zum Wildtyp ein geringerer Lungenschaden aber eine unveränderte Nierenschädigung. Somit scheint IL33 eine Rolle bei der Makrophagen-vermittelten

7. Zusammenfassung

Organschädigung in der Pankreatitis zu spielen, die sich auf Grund von kompensatorischen Regulationsmechanismen im globalen IL33 Knock-out weniger gut belegen lässt als nach IL33 Inhibition. Die Hemmung von IL33 zur Behandlung der akuten Pankreatitis stellt somit ein vielversprechendes Therapieprinzip dar.

8. Material

8.1 Mausstämme / Zelllinien

C57Bl/6	Charles River	Sulzfeld, Deutschland
IL33Gt/+	Texas A&M Institute for genomic Medicine	Tamu, Texas
IL33 -/-	Zucht Pathologie	Greifswald, D

8.2 Verbrauchsmaterial

Wattestäbchen	DM	Greifswald	-
Faden Mariderm blau	Catgut	Markneukirchen, D	17217423
Faden Polyester weiß	Catgut	Markneukirchen, D	17218113
1 ml Spritzen	BD Plastipak	Madrid, Spanien	303172
Spitzen	BRAUN	Melsungen, D	4657853
Mikro-Hämatokrit Kapillare	BRAND GMBH	Wertheim, Deutschland	7493 11
Serumröhrchen	BD Vacutainer	Plymouth, UK	367955
Paraffinkammern	TissueTek	Torrance, USA	4156F
FACS Tubes	Sarstedt	Nümbrecht, D	55.1579
Cryomold	Science Services	München, D	4566
Cryoröhrchen	Greiner bio-one	Frickenhausen, D	126263
Fettstift	Daido Sangyo	Tokyo, Japan	-
Eindeckelgläser	Marienfeld	Königshofen, D	0101222
1,5 ml Eppie	Sarstedt	Nümbrecht, D	72.690.001
2 ml Eppie	Eppendorf	Hamburg, D	0030 120.094
15 ml Tube	Sarstedt	Nümbrecht, D	62.554.502
50 ml Tube	Greiner bio-one	Frickenhausen, D	227261
2 ml Spritze	BD Discardit	Fraga, Spanien	300928
70 µm Sieb	Greiner bio-one	Frickenhausen, D	542070
10 cm Schale	Sarstedt	Nümbrecht, D	83.3902
Pipette 5 ml	Sarstedt	Nümbrecht, D	86.1253.001
Pipette 10 ml	Sarstedt	Nümbrecht, D	86.1254.001
Pipette 25 ml	Sarstedt	Nümbrecht, D	86.1685.001
Handschuhe	Hartmann	Heidenheim, D	942196
Spitzen Surphob	Biozym	Oldendorf, D	10 µl, 200µl, 1000µl
Zellschaber	Sarstedt	Nümbrecht, D	83.1830

8. Material

Ketamin	Selectavet	Weyarn, D	K2810-03
Xylasol	Selectavet	Weyarn, D	1870061A
Ethanol	Chem Solute	Renningen, D	2246.2500
Mitamizol	MSD Animal Health	Apotheke	0030319
PBS + H ₂ O	Merck	Darmstadt, D	C188-50
Caerulein	Sigma Aldrich	Darmstadt, D	C9026-1MG
Formaldehyd 4,5%	Uni Aoptheke	Greifswald, D	-
TissueTec	Sakura	Tokyo, Japan	4583
FCS	PAN Biotech	Aidenbach, D	P30-3302
Eindeckelmedium	DAKO	Carpinteria, USA	S3023
RNAse freies H ₂ O	Ambion	Waltham, USA	AM9920
PenStrep	Gibco	Waltham, USA	15140-122
Isofluoran	CP Pharme	Burgdorf, D	1214
C Tubes, gentle MACS	Miltenyi	Bergisch-Gladbach, D	130096334
MACS smart strainer 70 µm	Miltenyi	Bergisch Gladbach, D	130-110-916

8.2.1 H&E-Färbung

Hämatoxylin	Sigma Aldrich	Darmstadt, D	MH S32-1L
Eosin	Sigma Aldrich	Darmstadt, D	HT1110232-1L
Aceton	Roth	Karlsruhe, D	5025.1
Xylol	Roth	Karlsruhe, D	9713.3
Methanol	J T Baker/Fisher	Dublin, Irland	8402
Vecta Mount Medium	Vectot Laboratories	Burlingame, USA	H5000

8.3 Kits

Amylase	Roche/Hitachi	Mannheim, D	11876473316
Lipase	Roche/Hitachi	Mannheim, D	11821792216
β-Galactosidase Reporter Gene Staining Kit	Sigma Aldrich	St-Louis, USA	GALS-1 KT
IL33 ELISA	R&D Systems	Minneapolis, USA	DY3626-05
DAB Kit	Vector	Burlingame, USA	SK4100
Lung Dissociation Kit	Miltenyi	Bergisch Gladbach, D	130-112-961
Easy Sep mouse Monozytes Isolation Kit	STEMCELL	Grenoble, F	19861A
Creatinine ELISA	LSBio	Seattle, USA	LS-F39289

8.4 Antikörper

Anti-CD68	Antibodies-online	Aachen, D	ABIN181836
Anti-CD206 Mrc1	Avivasysbio	San Diego, USA	OASA05048-25
Anti-Ly6G	Abcam	Berlin, D	Ab25377
Anti-rat Cy3	Jackson Immuno	Cambridge, UK	112-165-062
DAPI	Roth	Karlsruhe, D	6335.1
Anti-CD4 PE	BioLegend	San Diego, USA	100408
Anti-CD25 PE Cy7	BioLegend	San Diego, USA	102016
Anti-CD69 BV510	BioLegend	San Diego, USA	104532
Anti-CD8a BV605	BioLegend	San Diego, USA	100743
Anti-Gata3 BV421	BioLegend	San Diego, USA	653814
Anti-tbet PerCP/Cy5.5	BioLegend	San Diego, USA	644806
Anti- RorC Vio515	Miltenyi	Bergisch Gladbach, D	130-108-834
Anti-FoxP3 APC	Miltenyi	Bergisch Gladbach, D	130-113-470
Anti-CD4 BV650	BioLegend	San Diego, USA	100546
Anti-CD206 APC	BioLegend	San Diego, USA	141708
Anti-Ly6G BV421	BioLegend	San Diego, USA	127628
Anti-Ly6C BV605	BioLegend	San Diego, USA	128036
Anti-CD163 PE	Invitrogen	Carlsbad, USA	12-1631-82
Anti-CD62L Alexa488	BioLegend	San Diego, USA	104420
Anti-CD11b PerCP Cy5.5	BioLegend	San Diego, USA	101228
Lin Marker Alexa700	BioLegend	San Diego, USA	79923
Isotyp Lin Marker	BioLegend	San Diego, USA	79924
Anti-CD90 BV605	BioLegend	San Diego, USA	105343
Anti-CD127 BV650	BioLegend	San Diego, USA	135043
Anti-CD45 PE	BioLegend	San Diego, USA	103106
Anti-RorC APC	Invitrogen	Carlsbad, USA	17-6988-82
Anti-FoxP3 Alexa488	Invitrogen	Carlsbad, USA	53-4774-42
Fc Blocking mouse	Miltenyi	Bergisch Gladbach, -D	130-092-575
Anti-mIL33	R&D systems	Minneapolis, USA	AF3626
Anti-goat HRP	Jackson Immuno	Cambridge, UK	305-035-045
Anti-Ly6G	BioXcell	Lebanon, USA	BP0075-1
Anti-CCR	Matthias Mack	Regensburg, D	
Isotyp	BioXcell	Lebanon, USA	BP0089
Rabbit anti-CD11b	Abcam	Cambridge, UK	Ab133357
Anti rabbit HRP	DAKO	Jena, D	K4006

8. Material

8.5 Geräte

CASY	Omni life science	Bremen, D
Eppiezentrifuge	Eppendorf 5417R	Hamburg, D
Zentrifuge Lager	Eppendorf 5810R	Hamburg, D
Zentrifuge Zellkultur	Eppendorf	Hamburg, D
Heizblock	Profcontrol	Glien, D
Douncer	Sigma Aldrich	St Louis, USA
Ultraschall	Bandelin Sono Plus	Berlin, D
Photometer SpectraMax Plus	Molecular Devices	San Jose, USA
Inkubator Zellkultur	Binder	Tuttlingen, D
Inkubator Proteinlabor	Heraeus B5042E	Hanau, D
Kühlschrank	Iarp	-
Rotator MACS	Miltenyi	Bergisch Gladbach
Wasserbad	GFL	Burgwedel, D
Tiefkühler	Liebherr	Ochsenhausen, D
Cycler	Eppendorf	Hamburg, D
qRT-PCR Cycler	BioRad Thermo Fischer	Waltham, USA
RT-DC	Oliver Otto	Greifswald, D
Tissue Lyser	Qiagen	Hilden, D

8.6 Chemikalien

TRIZOL	Ambion	Carlsbad, USA	15596018
Chloroform	Merck	Darmstadt, D	1.02431.2500
Isopropanol	Sigma Aldrich	Darmstadt	16515
H ₂ O ₂	Merck	Darmstadt, D	1.07209.1000
o-Dianosidine dihydrochlorid	Sigma Aldrich	Darmstadt, D	D3252
Bradford Reagenz	Sigma Aldrich	Darmstadt, D	B6916-500ml
Imidazol	Sigma Aldrich	Darmstadt, D	I2399
SYBR	Thermo Fischer	Waltham, USA	4309155
Antigenretrieval	DAKO	Jena, D	S1699

8. Material

8.7 Puffer/ Gele

MPO Messpuffer	KH ₂ PO ₄ (50mM)	Merck	1.04873.0250
Homogenisierungspuffer	KH ₂ PO ₄ (20mM)	Merck	1.04873.0250
Extraktionspuffer	Messpuffer EDTA PMSF Hexacetyltrimethyl- ammoniumbromid	s.o Roth Sigma Roth	- 8043.2 P7626 -
Azinusisolation	DMEM High glucose HEPES BSA PenStrep Salzsäure	Gibco Sigma Pan Biotech Gibco Merck	31966-021 H7006 P06-1391500 15140-122 1.00317.1000
NET 0,2% Gelatine	Gelatine	Roth	4274.1
FACS Puffer	Natriumacid FCS EDTA	Merck PAN Biotech Roth	1.06688.0100 P30-3302 8043.2
Lysepuffer Erythrozyten	NH ₄ Cl KHCO ₃ EDTA	Roth Merck Roth	K298.2 1.06329.1000 8043.2

8.8 Stimulation / Zytokine / Proteasen

sST2	R&D Systems	Minneapolis, USA	1004-MR
LPS	Sigma Aldrich	Darmstadt, D	L2654
M-CSF	Peptrotech	Hamburg, D	315-02-2UG
Cholecystokin CCK	Sigma Aldrich	Darmstadt, D	C2901-1MG

8.9 Primer

NGAL	5'- CACCACGGACTACAACCAGT TCGC-3'	5'- TCAGTTGTCAATGCATTGGTCG GTG-3'
5S	5'- GCCCGATCTCGTCTGATCTC- 3'	5'- GCCTATCAGCACCCGGTATTC- 3'

8.10 Medium

RPMI	Gibco	Paisley, UK	21875-034
DMEM high glucose	Gibco	Paisley, UK	31966-021

8. Material

8.11 Gegenstände

Kolben klein	Simax	-	-
Kolben groß	Simax	-	-
Schere grade Schere gebogen	Hammacher	Solingen, D	HSB_008-13 HSB_009-13
Pinzette	Hammacher	Solingen, D	HSC_189-13
Nadelhalter	Hammacher	Solingen, D	HSE_027-18

8.12 Software

FlowJo 10.3	Tree Star Inc., Ashland, OR, USA
DIVA	BD,
GraphPad Prism 5.0	San Diego, CA, USA
RosettaResolver	-
Quant Center Sysmex	Norderstedt, Deutschland
Shape Out	Zellmechanik Dresden, D

9. Literaturverzeichnis

1. Garg PK, Singh VP. Organ Failure Due to Systemic Injury in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2019;156(7):2008–23.
2. Dambrauskas Z, Giese N, Gulbinas A, Giese T, Berberat PO, Pundzius J, u. a. Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 21. April 2010;16(15):1845–53.
3. Gea-Sorlí S, Closa D. Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 6. Oktober 2010;1(5):107–11.
4. Peery AF, Dellon ES, Lund J, Crockett SD, McGowan CE, Bulsiewicz WJ, u. a. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology*. November 2012;143(5):1179-1187.e3.
5. Frossard J-L, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet*. 12. Januar 2008;371(9607):143–52.
6. Gorelick FS. Alcohol and zymogen activation in the pancreatic acinar cell. *Pancreas*. November 2003;27(4):305–10.
7. Glasbrenner B, Adler G. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology*. Dezember 1993;40(6):517–21.
8. Sendler M, Maertín S, John D, Persike M, Weiss FU, Krüger B, u. a. Cathepsin B Activity Initiates Apoptosis via Digestive Protease Activation in Pancreatic Acinar Cells and Experimental Pancreatitis. *J Biol Chem*. 8. Juli 2016;291(28):14717–31.
9. Petrov MS, Shanbhag S, Chakraborty M, Phillips ARJ, Windsor JA. Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis. *Gastroenterology*. September 2010;139(3):813–20.
10. Nøjgaard C, Becker U, Matzen P, Andersen JR, Holst C, Bendtsen F. Progression from acute to chronic pancreatitis: prognostic factors, mortality, and natural course. *Pancreas*. November 2011;40(8):1195–200.
11. Yadav D, O'Connell M, Papachristou GI. Natural history following the first attack of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. Juli 2012;107(7):1096–103.
12. Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ. Chronic pancreatitis. *Lancet*. 2. April 2011;377(9772):1184–97.
13. Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*. April 2007;132(4):1557–73.
14. Lee B, Adamska JZ, Namkoong H, Bellin MD, Wilhelm J, Szot GL, u. a. Distinct immune characteristics distinguish hereditary and idiopathic chronic pancreatitis. *J Clin Invest*. 1. Mai 2020;130(5):2705–11.

9. Literaturverzeichnis

15. Pujahari AK. Chronic Pancreatitis: A Review. *Indian J Surg.* Dezember 2015;77(Suppl 3):1348–58.
16. Maisonneuve P, Frulloni L, Müllhaupt B, Faitini K, Cavallini G, Lowenfels AB, u. a. Impact of smoking on patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Pancreas.* August 2006;33(2):163–8.
17. Chen J-M, Férec C. Chronic pancreatitis: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:63–87.
18. Zheng L, Xue J, Jaffee EM, Habtezion A. Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology.* Juni 2013;144(6):1230–40.
19. Chaplin DD. 1. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* Februar 2003;111(2 Suppl):S442-459.
20. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 15. Januar 2010;327(5963):291–5.
21. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 7. Januar 2014;2(1):1.
22. Rosales C, Lowell CA, Schnoor M, Uribe-Querol E. Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity 2017. *J Immunol Res.* 2017;2017:9748345.
23. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, u. a. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog.* März 2015;11(3):e1004651.
24. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, u. a. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell.* 23 2018;174(5):1054–66.
25. Vivier E, van de Pavert SA, Cooper MD, Belz GT. The evolution of innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 21 2016;17(7):790–4.
26. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev.* März 2010;234(1):45–54.
27. Nussenzweig MC, Steinman RM, Gutchinov B, Cohn ZA. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1. Oktober 1980;152(4):1070–84.
28. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol.* 2015;6:620.
29. Anaya J-M, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Levy RA, Cervera R, Herausgeber. Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 [zitiert 26. Mai 2020]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459447/>
30. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 19. März 2010;140(6):805–20.

9. Literaturverzeichnis

31. Toor AA, Toor AA, Rahmani M, Manjili MH. On the organization of human T-cell receptor loci: log-periodic distribution of T-cell receptor gene segments. *J R Soc Interface*. Januar 2016;13(114):20150911.
32. Corthay A. A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scand J Immunol*. August 2006;64(2):93–6.
33. Dustin ML. The immunological synapse. *Cancer Immunol Res*. November 2014;2(11):1023–33.
34. Prendergast GC, Jaffee EM, Herausgeber. *Cancer immunotherapy: immune suppression and tumor growth*. Second edition. Amsterdam; Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier; 2013. 655 S.
35. Folias AE, Penaranda C, Su AL, Bluestone JA, Hebrok M. Aberrant innate immune activation following tissue injury impairs pancreatic regeneration. *PLoS ONE*. 2014;9(7):e102125.
36. Liou G-Y, Döppler H, Necela B, Krishna M, Crawford HC, Raimondo M, u. a. Macrophage-secreted cytokines drive pancreatic acinar-to-ductal metaplasia through NF- κ B and MMPs. *J Cell Biol*. 5. August 2013;202(3):563–77.
37. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. Dezember 2008;8(12):958–69.
38. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1. Juli 1992;176(1):287–92.
39. Criscimanna A, Coudriet GM, Gittes GK, Piganelli JD, Esni F. Activated macrophages create lineage-specific microenvironments for pancreatic acinar- and β -cell regeneration in mice. *Gastroenterology*. November 2014;147(5):1106-1118.e11.
40. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *J Clin Invest*. 15. Februar 1998;101(4):890–8.
41. Lundberg AH, Eubanks JW, Henry J, Sabek O, Kotb M, Gaber L, u. a. Trypsin stimulates production of cytokines from peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Pancreas*. Juli 2000;21(1):41–51.
42. Gloor B, Blinman TA, Rigberg DA, Todd KE, Lane JS, Hines OJ, u. a. Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats. *Pancreas*. November 2000;21(4):414–20.
43. Habtezion A. Inflammation in acute and chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol*. September 2015;31(5):395–9.
44. Mosmann TR, Coffman RL. Two types of mouse helper T-cell clone Implications for immune regulation. *Immunol Today*. 1987;8(7–8):223–7.

9. Literaturverzeichnis

45. Hoe E, Anderson J, Nathanielsz J, Toh ZQ, Marimla R, Balloch A, u. a. The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease. *Microbiol Immunol.* Februar 2017;61(2):49–56.
46. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, u. a. Transforming growth factor-beta „reprograms“ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* Dezember 2008;9(12):1341–6.
47. Xin J, Wainwright DA, Mesnard NA, Serpe CJ, Sanders VM, Jones KJ. IL-10 within the CNS is necessary for CD4+ T cells to mediate neuroprotection. *Brain Behav Immun.* Juli 2011;25(5):820–9.
48. Rayasam A, Hsu M, Hernández G, Kijak J, Lindstedt A, Gerhart C, u. a. Contrasting roles of immune cells in tissue injury and repair in stroke: The dark and bright side of immunity in the brain. *Neurochem Int.* Juli 2017;107:104–16.
49. Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol.* Februar 2004;202(2):145–56.
50. Mayerle J, Dummer A, Sendler M, Malla SR, van den Brandt C, Teller S, u. a. Differential roles of inflammatory cells in pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* März 2012;27 Suppl 2:47–51.
51. Sendler M, van den Brandt C, Glaubitz J, Wilden A, Golchert J, Weiss FU, u. a. NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Response and Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndromes in Mice With Acute Pancreatitis. *Gastroenterology.* 2020;158(1):253-269.e14.
52. Gunjaca I, Zunic J, Gunjaca M, Kovac Z. Circulating cytokine levels in acute pancreatitis-model of SIRS/CARS can help in the clinical assessment of disease severity. *Inflammation.* April 2012;35(2):758–63.
53. Montecucco F, Mach F, Lenglet S, Vonlaufen A, Gomes Quinderé AL, Pelli G, u. a. Treatment with Evasin-3 abrogates neutrophil-mediated inflammation in mouse acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest.* Oktober 2014;44(10):940–50.
54. Gukovskaya AS, Vaquero E, Zaninovic V, Gorelick FS, Lulis AJ, Brennan M-L, u. a. Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology.* April 2002;122(4):974–84.
55. Abdulla A, Awla D, Thorlacius H, Regnér S. Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis. *J Leukoc Biol.* November 2011;90(5):975–82.
56. Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002;9(4):401–10.
57. Saeki K, Kanai T, Nakano M, Nakamura Y, Miyata N, Sujino T, u. a. CCL2-induced migration and SOCS3-mediated activation of macrophages are involved in cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology.* April 2012;142(4):1010-1020.e9.

9. Literaturverzeichnis

58. Demols A, Le Moine O, Desalle F, Quertinmont E, Van Laethem JL, Devière J. CD4(+) T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice. *Gastroenterology*. März 2000;118(3):582–90.
59. Liu Y, Wang L, Cai Z, Zhao P, Peng C, Zhao L, u. a. The Decrease of Peripheral Blood CD4+ T Cells Indicates Abdominal Compartment Syndrome in Severe Acute Pancreatitis. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0135768.
60. Glaubitz J, Wilden A, van den Brandt C, Weiss FU, Bröker BM, Mayerle J, u. a. Experimental pancreatitis is characterized by rapid T cell activation, Th2 differentiation that parallels disease severity, and improvement after CD4+ T cell depletion. *Pancreatology*. 19. Oktober 2020;
61. Johnson CD, Abu-Hilal M. Persistent organ failure during the first week as a marker of fatal outcome in acute pancreatitis. *Gut*. September 2004;53(9):1340–4.
62. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, u. a. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. Januar 2013;62(1):102–11.
63. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Sullivan T. The changing character of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, and prognosis. *Curr Gastroenterol Rep*. April 2009;11(2):97–103.
64. Wig JD, Bharathy KGS, Kochhar R, Yadav TD, Kudari AK, Doley RP, u. a. Correlates of organ failure in severe acute pancreatitis. *JOP*. 18. Mai 2009;10(3):271–5.
65. Schepers NJ, Bakker OJ, Besselink MG, Ahmed Ali U, Bollen TL, Gooszen HG, u. a. Impact of characteristics of organ failure and infected necrosis on mortality in necrotising pancreatitis. *Gut*. 2019;68(6):1044–51.
66. Pastor CM, Matthay MA, Frossard J-L. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest*. Dezember 2003;124(6):2341–51.
67. Mokra D, Kosutova P. Biomarkers in acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol*. April 2015;209:52–8.
68. Mortelliti MP, Manning HL. Acute respiratory distress syndrome. *Am Fam Physician*. 1. Mai 2002;65(9):1823–30.
69. Wajda J, Dumnicka P, Maraj M, Ceranowicz P, Kuźniewski M, Kuśnierz-Cabala B. Potential Prognostic Markers of Acute Kidney Injury in the Early Phase of Acute Pancreatitis. *Int J Mol Sci*. 30. Juli 2019;20(15).
70. Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Pediatr*. April 2011;23(2):194–200.
71. Beker BM, Corleto MG, Fieiras C, Musso CG. Novel acute kidney injury biomarkers: their characteristics, utility and concerns. *Int Urol Nephrol*. April 2018;50(4):705–13.
72. Zhou J, Li Y, Tang Y, Liu F, Yu S, Zhang L, u. a. Effect of acute kidney injury on mortality and hospital stay in patient with severe acute pancreatitis. *Nephrology (Carlton)*. Juli 2015;20(7):485–91.

9. Literaturverzeichnis

73. Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T, Takeuchi T, u. a. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* November 1999;19(11):1279–88.
74. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, u. a. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* November 2005;23(5):479–90.
75. Dinarello CA. An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor. *Immunity.* November 2005;23(5):461–2.
76. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm (Lond).* 26. August 2011;8(1):22.
77. Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev.* 2018;281(1):154–68.
78. Altara R, Ghali R, Mallat Z, Cataliotti A, Booz GW, Zouein FA. Conflicting vascular and metabolic impact of the IL-33/sST2 axis. *Cardiovasc Res.* 01 2018;114(12):1578–94.
79. Cayrol C, Girard J-P. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol.* Dezember 2014;31:31–7.
80. Kotsiou OS, Gourgoulisanis KI, Zarogiannis SG. IL-33/ST2 Axis in Organ Fibrosis. *Front Immunol.* 2018;9:2432.
81. Lefrançois E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard J-P, u. a. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci USA.* 31. Januar 2012;109(5):1673–8.
82. Li D, Guabiraba R, Besnard A-G, Komai-Koma M, Jabir MS, Zhang L, u. a. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol.* Dezember 2014;134(6):1422-1432.e11.
83. Lefrançois E, Duval A, Mirey E, Roga S, Espinosa E, Cayrol C, u. a. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 28. Oktober 2014;111(43):15502–7.
84. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, u. a. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 23. September 2010;363(13):1211–21.
85. Xu D, Jiang H-R, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, u. a. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 5. August 2008;105(31):10913–8.
86. Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spina L, Mattioli B, Scarpa M, u. a. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative

9. Literaturverzeichnis

- colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 27. April 2010;107(17):8017–22.
87. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie ANJ, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest*. Juni 2007;117(6):1538–49.
 88. Liu C-L, Shen D-L, Zhu K, Tang J-N, Hai Q-M, Zhang J-Y. Levels of interleukin-33 and interleukin-6 in patients with acute coronary syndrome or stable angina. *Clin Invest Med*. 1. August 2013;36(4):E234-241.
 89. Ouziel R, Gustot T, Moreno C, Arvanitakis M, Degré D, Trépo E, u. a. The ST2 pathway is involved in acute pancreatitis: a translational study in humans and mice. *Am J Pathol*. Juni 2012;180(6):2330–9.
 90. Kempuraj D, Twait EC, Williard DE, Yuan Z, Meyerholz DK, Samuel I. The novel cytokine interleukin-33 activates acinar cell proinflammatory pathways and induces acute pancreatic inflammation in mice. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e56866.
 91. Moulin D, Donzé O, Talabot-Ayer D, Mézin F, Palmer G, Gabay C. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine*. Dezember 2007;40(3):216–25.
 92. Gachago C, Draganov PV. Pain management in chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 28. Mai 2008;14(20):3137–48.
 93. Testoni PA. Endoscopic stenting in benign pancreatic diseases. *JOP*. 9. Januar 2007;8(1 Suppl):141–50.
 94. Otto O, Rosendahl P, Mietke A, Golfier S, Herold C, Klaue D, u. a. Real-time deformability cytometry: on-the-fly cell mechanical phenotyping. *Nat Methods*. März 2015;12(3):199–202, 4 p following 202.
 95. Fu Q, Zhai Z, Wang Y, Xu L, Jia P, Xia P, u. a. NLRP3 Deficiency Alleviates Severe Acute Pancreatitis and Pancreatitis-Associated Lung Injury in a Mouse Model. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1294951.
 96. Pezzilli R, Bellacosa L, Felicani C. Lung injury in acute pancreatitis. *JOP*. 4. September 2009;10(5):481–4.
 97. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, u. a. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis*. September 2008;52(3):595–605.
 98. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. November 2011;121(11):4210–21.
 99. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. April 2011;7(4):189–200.
 100. Tsukahara Y, Horita Y, Anan K, Morisaki T, Tanaka M, Torisu M. Role of nitric oxide derived from alveolar macrophages in the early phase of acute pancreatitis. *J Surg Res*. November 1996;66(1):43–50.

9. Literaturverzeichnis

101. Ivetic A. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour. *Cell Tissue Res.* 2018;371(3):437–53.
102. Yang Z-W, Meng X-X, Xu P. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *J Cell Mol Med.* November 2015;19(11):2513–20.
103. Inoue S, Nakao A, Kishimoto W, Murakami H, Itoh K, Itoh T, u. a. Anti-neutrophil antibody attenuates the severity of acute lung injury in rats with experimental acute pancreatitis. *Arch Surg.* Januar 1995;130(1):93–8.
104. Perides G, Weiss ER, Michael ES, Laukkanen JM, Duffield JS, Steer ML. TNF-alpha-dependent regulation of acute pancreatitis severity by Ly-6C(hi) monocytes in mice. *J Biol Chem.* 15. April 2011;286(15):13327–35.
105. Sendler M, Dummer A, Weiss FU, Krüger B, Wartmann T, Scharffetter-Kochanek K, u. a. Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. *Gut.* März 2013;62(3):430–9.
106. Tsuji Y, Watanabe T, Kudo M, Arai H, Strober W, Chiba T. Sensing of commensal organisms by the intracellular sensor NOD1 mediates experimental pancreatitis. *Immunity.* 24. August 2012;37(2):326–38.
107. Guice KS, Oldham KT, Caty MG, Johnson KJ, Ward PA. Neutrophil-dependent, oxygen-radical mediated lung injury associated with acute pancreatitis. *Ann Surg.* Dezember 1989;210(6):740–7.
108. van der Veen BS, de Winther MPJ, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* November 2009;11(11):2899–937.
109. Florentin J, Coppin E, Vasamsetti SB, Zhao J, Tai Y-Y, Tang Y, u. a. Inflammatory Macrophage Expansion in Pulmonary Hypertension Depends upon Mobilization of Blood-Borne Monocytes. *J Immunol.* 15 2018;200(10):3612–25.
110. Meng F, Lowell CA. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med.* 5. Mai 1997;185(9):1661–70.
111. Sendler M, Weiss F-U, Golchert J, Homuth G, van den Brandt C, Mahajan UM, u. a. Cathepsin B-Mediated Activation of Trypsinogen in Endocytosing Macrophages Increases Severity of Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology.* 2018;154(3):704-718.e10.
112. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh K, Kanno A, Shimosegawa T. Nuclear expression of interleukin-33 in pancreatic stellate cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* Oktober 2010;299(4):G821–32.
113. Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, u. a. Endogenous IL-33 Is Highly Expressed in Mouse Epithelial Barrier Tissues, Lymphoid Organs, Brain, Embryos, and Inflamed Tissues: In Situ Analysis Using a Novel *Il-33-LacZ* Gene Trap Reporter Strain. *Jl.* 1. April 2012;188(7):3488–95.

9. Literaturverzeichnis

114. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* Oktober 2008;7(10):827–40.
115. Li L, Sun Z, Xu C, Wu J, Liu G, Cui H, u. a. Adenovirus-mediated overexpression of sST2 attenuates cardiac injury in the rat with severe acute pancreatitis. *Life Sci.* 1. Juni 2018;202:167–74.
116. Allinne J, Scott G, Lim WK, Birchard D, Erjefält JS, Sandén C, u. a. IL-33 blockade affects mediators of persistence and exacerbation in a model of chronic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(6):1624-1637.e10.
117. Jin R, Xu J, Gao Q, Mao X, Yin J, Lu K, u. a. IL-33-induced neutrophil extracellular traps degrade fibronectin in a murine model of bronchopulmonary dysplasia. *Cell Death Discov.* Dezember 2020;6(1):33.
118. Wang K, Shan S, Yang Z, Gu X, Wang Y, Wang C, u. a. IL-33 blockade suppresses tumor growth of human lung cancer through direct and indirect pathways in a preclinical model. *Oncotarget.* 15. September 2017;8(40):68571–82.

10. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Unterschrift des Promovenden

11. Danksagung

Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

-Johann Wolfgang von Goethe-